EINE ANALYSE DER BEZIEHUNGEN ZWISCHEN BETAREZEPTOREN UND DEM SCHRITTMACHERSTROM AM HERZEN

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich - Wilhelms - Universität
zu Bonn

vorgelegt von
ROLF ZISKOVEN
aus Düsseldorf

Bonn 1979

EINE ANALYSE DER BEZIEHUNGEN ZWISCHEN BETAREZEPTOREN UND DEM SCHRITTMACHERSTROM AM HERZEN

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich - Wilhelms - Universität
zu Bonn

vorgelegt von
ROLF ZISKOVEN
aus Düsseldorf

Bonn 1979

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Otto Hauswirth
2. Gutachter: Prof. Dr. Günther Fricke

Aus dem Physiologischen Institut II
der Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. Dr. Hans Georg Haas

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Druck: Richard Schwarzbold, Witterschlick b. Bonn

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546505_0046

Abstract

Ziskoven, Rolf

Eine Analyse der Beziehungen zwischen Betarezeptoren und dem Schrittmacherstrom am Herzen

In der vorliegenden Arbeit wird bezeigt, daß die Steuerung des Schrittmacherstromes am Herzen über Betarezeptoren erfolgt. Es wurden dazu an Purkinje Fasern des Schafsherzen vollständige voltage clamp Anaylsen durchgeführt, die im einzelnen beweisen, daß Adrenalin die Kinetik des Schrittmacherstromes in die depolarisierende Richtung verschiebt, Betablocker diesen Effekt jedoch wieder aufheben können.

Der Einfluß von Alpharezeptoren auf dieses System wurde ebenso ausgeschlossen wie die Beteiligung des lokalanästhetischen Nebeneffektes vieler Betablocker.

Ohne vorherige Stimulation der Betarezeptoren haben Betablocker von sich aus keinen Einfluß auf den Schrittmacherstrom am Herzen.

Die Rezeptoren selbst sind stereospezifisch.

Inhaltsangabe

	Seite
EINLEITUNG	9
THEORIE	12
Allgemeine theoretische Grundlagen	12
Das Schrittmachersystem	24
METHODEN	27
Präparate	27
Voltage **clamp Anlage**	28
a) Das Bad	29
b) Das Flüssigkeitssystem	31
c) Die elektronische Anlage	32
Schutz der Faser	34
Mögliche Fehler	35
RESULTATE	37
Der Schrittmacherstrom und Alpharezeptoren	37
Lokalanästhetika sowie lokalanästhetische Nebenwirkungen vieler Betarezeptorenblocker sind auf den Schrittmacherstrom ohne Einfluß	45
Änderung der Zeitkonstanten	52
Die Verschiebung der Geschwindigkeitskonstanten der physiko-chemischen Reaktionen des gating Mechanismus	54
Keine Veränderung der vollaktivierten Strom-Spannungs-Beziehung	58
Effekt des Betablockers Penbutolol (l-Isomer) auf den Schrittmacherstrom ohne vorherige Applikation von Adrenalin	61

Seite

Die vollaktivierte Strom-Spannungs-Beziehung 66

Stereoselektivität der Betarezeptorenblocker 67

DISKUSSION 74

ANHANG I 78

ANHANG II 86

LITERATURVERZEICHNIS 88

EINLEITUNG

Der beschleunigende Effekt von Adrenalin auf den Schrittmacherstrom am Herzen wurde 1968 erstmals durch eine voltage clamp-Analyse an Schafs-Purkinje Fasern von Hauswirth, Noble und Tsien (1968) in den Laboratorien der Universität Oxford untersucht. Hodgkin und Huxley haben 1952 eine sehr sinnvolle Verstärkeranordnung beschrieben, die auf dem Prinzip der negativen Rückkopplung beruht und die es erlaubt, der Membran eines biologischen Präparates - wie zum Beispiel einer Nervenfaser - ein vom Experimentator willkürlich gewähltes Potential aufzuzwingen. Diese Klemm-Spannungs-Methode - im angelsächsischen Sprachraum voltage clamp genannt - wurde erstmals von Deck, Kern und Trautwein, 1964, mit Hilfe zweier Mikroelektroden auf den Herzmuskel (Purkinje Faser) angewandt. Durch die Begrenzung der Länge des kabelartigen Präparates auf eine Längenkonstante (ca. 2 mm, Weidmann, 1952) wurden sogenannte "Kabelkomplikationen" weitgehend vermieden. (Über die Beschränkung der Anwendbarkeit dieser Methode und über mögliche Fehlerquellen siehe Methoden.)

Die für die Methode notwendigen theoretischen Grundlagen waren in den Jahren zuvor hauptsächlich von Denis Noble und Mitarbeitern (McAllister und Noble, 1968; Noble und Tsien, 1968; Hauswirth, Noble und Tsien, 1972b) in verschiedenen Arbeiten vorgestellt worden. Es ist im Eigentlichen ihr Verdienst, daß die geniale Theorie von Hodgkin und Huxley auf den Schrittmacherstrom am Herzen angewendet werden konnte.

Somit war es möglich, ein sehr komplexes Stromsystem in allen Einzelheiten zu analysieren und zu interpretieren. Die pharmakologischen Arbeiten aus dem klinischen Bereich der Medizin konnten molekularbiologisch nachvollzogen und bestätigt oder korrigiert werden.

Hauswirth, Noble und Tsien (1968) und Tsien (1974a, b) konnten zeigen, daß Adrenalin und Isoproterenol die Spannungsabhängigkeit der Kinetik des Schrittmacherstromes (siehe Theorie) in die depolarisierende Richtung verschob, während betablockierende Substanzen diese Verschiebung rückgängig machten.

(Pronethalol, Hauswirth, Noble und Tsien, 1968; Propranolol, Tsien, 1974a) Diese Resultate deckten sich mit den Ergebnissen aus der Klinik,und es war Tsien, der 1974 die Hypothese aufstellte, daß der Schrittmacherstrom am Herzen von Betarezeptoren gesteuert wird.

Nunmehr konnte diese Hypothese nicht ohne weiteres bewiesen werden, da bis heute niemand eine genaue Vorstellung hat, was ein Betarezeptor ist,und wie man sich den Aufbau desselben vorzustellen hat.

Nach dem heutigen Stand des Wissens stellt man sich einen Membranstrom als Transport positiver oder negativer Ionen durch eine biologische Membran vor, für den nur relativ wenige Durchtrittsstellen (gleich Kanäle) in Frage kommen. Moore, Narahashi und Shaw haben 1967 festgestellt, daß am squid axon **nur** etwa zehn bis dreizehn Kanäle pro μm^2 vorhanden sind. Diese Kanäle sind streng spezifisch für bestimmte Ionen (Na^+, K^+, Ca^{++}, Cl^- (?)) und besitzen eine zeit- und spannungsabhängige Kinetik (gating Mechanismus). Noble und Tsien haben dann 1968 gezeigt, daß es sich beim Schrittmacherstrom am Herzen - i_{K2} genannt - um einen reinen Kaliumauswärtsstrom handelt.

Wie ein Kaliumkanal für den Schrittmacherstrom aussieht, und wie gar ein Betarezeptor die Kinetik eines solchen Kanales gewissermaßen fernsteuern soll, ist unbekannt. Außerdem besitzen viele sogenannte Betarezeptorenblocker einen ausgeprägten lokalanästhetischen Nebeneffekt, der gleichfalls für ihre Wirkung verantwortlich sein könnte. Darüber hinaus wiesen Cranefield, Hoffman und Wit (1971) sowie Giotti, Ledda und Mannaioni (1968, 1973) die Anwesenheit von Alpharezeptoren an Purkinje Fasern nach. Auch diese könnten theoretisch für die Steuerung des Schrittmacherstromes und seiner Kinetik verantwortlich sein, zumal - wie aus der Aufstellung der alpha- und betastimulierenden und -blockierenden Substanzen (Anhang I) hervorgeht - sich die pharmakologische Wirkung dieser Substanzen auf Alpha- bzw. Betarezeptoren sehr häufig überschneidet.

Rein chemische Überlegungen führten - trotz der Vielfalt der Gedanken und Möglichkeiten - ebenfalls nicht weiter. Allein die diesbezügliche Literatur anzugeben, die sich mit

Hypothesen über den Bau von Betarezeptoren und der chemischen Bindung zwischen Stimulator bzw. Blocker und Rezeptor beschäftigt, ist nahezu unmöglich, da dies ein eigenes Werk füllte.

Da mit der Technik von Deck, Kern und Trautwein (1964) sowie den theoretischen Überlegungen von Noble et al. ein ausgezeichnetes Werkzeug zur elektrophysiologischen Analyse zur Verfügung stand, galt es, folgende Fragen zu klären:

1) Sind Stimulatoren für Alpharezeptoren in der Lage, den Effekt von Adrenalin, eine Verschiebung der Kinetik des Schrittmacherstromes in die depolarisierende Richtung, zu kopieren; d.h., sind Alpharezeptoren an der Kontrolle des gating Mechanismus dieses Stromes beteiligt?

2) Können Lokalanästhetika die Verschiebung der Kinetik durch Adrenalin oder ähnliche Substanzen ebenso wie Betarezeptorenblocker rückgängig machen, ist also der lokalanästhetische Effekt vieler Betablocker für ihre Wirkung auf den Schrittmacherstrom verantwortlich?

3) Da l-Adrenalin wirksamer ist als das entsprechende d-Isomer, sollten auch die l-Isomer von Betarezeptorenblockern wirksamer sein; ist also der Rezeptor selbst stereospezifisch?

4) Welche Wirkung zeigen Betarezeptorenblocker auf den Schrittmacherstrom ohne vorherige Applikation von Adrenalin?

5) Können Betarezeptorenblocker die Membran vor dem Angriff von stimulierenden Substanzen schützen?

Die Beantwortung dieser Fragen sollte es ermöglichen, eine molekularbiologische Erklärung der Hypothese von Tsien zu geben. Die dazu notwendigen Experimente wurden angestellt,und ihre Ergebnisse sollen in dieser Arbeit dargelegt werden.

THEORIE

In den letzten Jahren wurden die Vorgänge, die dem Schrittmacherstrom in Purkinje Fasern zugrunde liegen, von vielen Autoren untersucht. (Hutter and Noble, 1960; Carmeliet, 1961; Hall, Hutter and Noble, 1961; Noble, 1962, 1967; Vasalle, 1966; McAllister and Noble 1966; Noble and Tsien, 1968; Hauswirth, Noble and Tsien, 1972; McAllister, Noble and Tsien, 1975)

Als gemeinsames Resultat dieser Untersuchungen erscheint, daß ein reiner Kaliumauswärtsstrom - i_{K2} genannt (Noble and Tsien, 1968) - über dem Schrittmacherpotential abfällt und dadurch einem oder mehreren einwärts gerichteten Leckstromkomponenten erlaubt, die Faser zu depolarisieren. Mit der voltage clamp-Technik (Deck, Kern und Trautwein, 1964) ist es möglich, die Zeit- und Spannungsabhängigkeit dieses Schrittmacherstromes zu analysieren.

Von einem Haltepotential aus, das im gesamten Spannungsbereich des Schrittmacherstromes (-90 bis -60 mV) frei gewählt werden kann, werden der Faser rechteckige Spannungssprünge appliziert, welche durch einen elektronischen feedback Mechanismus kontrolliert werden. Unter diesen Bedingungen - gleichgültig, ob die Pulse die Membran der Faser de- oder hyperpolarisieren - zeigt der Membranstrom, der registriert wird, sofort einen Stromsprung (instantaneous current jump), der von einem zeitabhängigen Strom gefolgt wird. Dieser langsame Anteil repräsentiert den Schrittmacherstrom.

Ein genau gleiches Verhalten zeigt der Membranstrom am Ende eines solchen Pulses - also bei der Rückkehr zum Haltepotential.

Abbildung 1 zeigt in idealisierter Form die Änderungen von Strom und Spannung während solcher Strompulse.

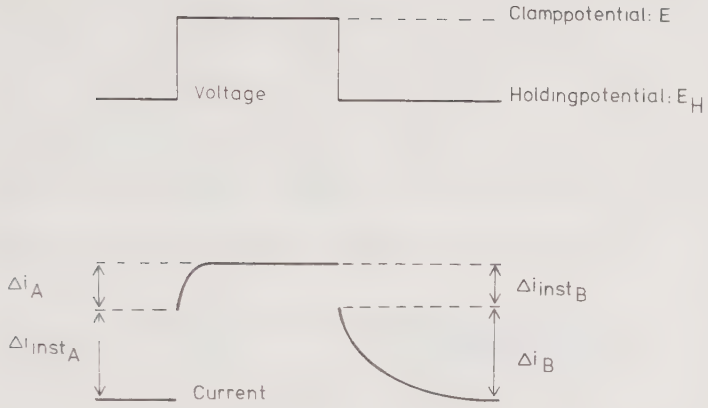


Abb. 1

Üblicherweise werden die langsamen Stromänderungen Δi_A und Δi_B dem Schrittmacherstrom i_{K2} zugeordnet, die schnellen Stromsprünge jedoch einem System, das mit i_{K1} bezeichnet wird. Ob dieses System i_{K1} nur von einer Sorte Ionen oder aber von mehreren getragen wird, ist bis heute nicht geklärt. - Eine Aussage läßt sich jedoch eindeutig treffen - wie in dieser Abhandlung gezeigt werden wird - die schnellen Stromsprünge enthalten einen Teil, der auf das Schrittmachersystem, i_{K2}, zurückgeführt werden kann; diese Stromsprünge daher in ihrer Gesamtheit i_{K1} zu nennen, ist somit zumindest mißverständlich. Aus diesem Grund werden die schnellen Stromsprünge hier mit Δi_{instA} und Δi_{instB} bezeichnet. (instantaneous current jumps)

Die komplette Stromänderung, die nach einer Änderung des Membranpotentials erscheint, kann somit in zwei Komponenten zerlegt werden:

$$\Delta i = \Delta i_{inst} + \Delta i_{K2}(t) , \qquad (1)$$

wobei nur $i_{K2}(t)$ eine Zeitabhängigkeit zeigt. Diese Zeitabhängigkeit wird durch eine Variable S(E,t) beschrieben, die eine Funktion des Membranpotentials E und der Zeit t ist. S ändert sich in einer bestimmten Zeit nach einem Sprung des Membranpotentials vom Haltepotential E_H zum gewählten Potential E von $S(E_H)$ nach S(E).

Nach einer genügend langen Zeit, die es dem System erlaubt, einen steady state zu erreichen, kann die Amplitude des langsam wachsenden Auswärtsstromes wie folgt beschrieben werden:

$$i_{K2}(t_\infty) = i \cdot [E, E_K, S(E)] - i \cdot [E, E_K, S(E_H)] \quad , \tag{2}$$

wobei E: das willkürlich eingestellte Potential (Klemmpotential)

E_K: das Kaliumgleichgewichtspotential

S(E): der Aktivierungsgrad von S am Potential E

$S(E_H)$: der Aktivierungsgrad von S am Haltepotential E_H

bedeuten.

Setzt man die treibende Kraft (driving force) - also die elektrochemische Potentialdifferenz - gleich $(E - E_K)$, so kann Gleichung (2) nach dem Ohmschen Gesetz umgeschrieben werden:

$$\Delta i_{K2}(t_\infty) = \left\{ g_{K2} \cdot [E, E_K, S(E)] - g_{K2} \cdot [E, E_K, S(E_H)] \right\} \cdot (E - E_K) \tag{3}$$

wobei $g_{K2} \cdot [E, E_K, S(E_H)]$ die Leitfähigkeit sofort nach der Erreichung des Klemmpotentials bedeutet. Diese Leitfähigkeit entspricht schon dem neuen Potential E, obwohl der Aktivierungsgrad S noch derjenige des Haltepotentials E_H ist, da $S(E_H)$ sich nur nach Ablauf einer bestimmten Zeit nach S(E) ändern kann. Sobald S den Wert S(E) erreicht hat - das ist der Aktivierungsgrad in der Höhe des Klemmpotentials - wird die Leitfähigkeit durch den Ausdruck $g_{K2} \cdot [E, E_K, S(E)]$ beschrieben. Die Zeitabhängigkeit dieses Stromsystemes ist also letztlich auf die zeitabhängige Änderung seiner Leitfähigkeit und somit dem Grad seiner Aktivierung zurückzuführen.

Vorausgesetzt, daß die Funktion der Leitfähigkeit im Intervall $[S(E_H), S(E)]$ stetig und differenzierbar ist, so folgt nach dem Mittelwertsatz der Differentialrechnung, daß es mindestens einen Wert $\sigma(E)$ mit der Eigenschaft

$$S(E_H) \leq \sigma(E) \leq S(E) = S(E_H) + \Delta S(E_H \longrightarrow E)$$

bzw.

$$S(E_H) \geq \sigma(E) \geq S(E) = S(E_H) - \Delta S(E_H \longrightarrow E)$$

geben muß, so daß schließlich Gleichung (3) als

$$\Delta i_{K2}(t_\infty) = \Delta S(E_H \longrightarrow E) \cdot \frac{dg_{K2}}{dS} \cdot [E, E_K, E_H, \sigma(E)] \cdot (E-E_K) \qquad (4)$$

geschrieben werden kann.
Der Differentialquotient dg_{K2}/dS hängt von der Länge und der Position des Intervalls $[S(E_H), S(E)]$ ab.
Setzt man

$$\frac{dg_{K2}}{dS} \cdot [E, E_K, E_H, \sigma(E)] = F_S(E, E_K, E_H),$$

so kommt man mit Gleichung (5) für die Amplitude der zeitabhängigen Stromkomponente zum gleichen Ergebnis wie Noble und Tsien 1968.

$$\Delta i_{K2}(t_\infty) = \Delta S(E_H \longrightarrow E) \cdot F_S(E, E_K, E_H) \cdot (E-E_K) \qquad (5)$$

Mißt man nun die gesamte Änderung des zeitabhängigen Stromsystemes nach der Rückkehr zum Haltepotential E_H und trägt diese als Funktion gegenüber dem Klemmpotential auf, so erhält man eine Kurve, wie sie in Abbildung 2 wiedergegeben ist. (für ein Haltepotential von -75 mV)
Ihre Gleichung lautet entsprechend:

$$\Delta i_{K2}(t_\infty) = \Delta S(E \longrightarrow E_H) \cdot F_S(E_H, E_K) \cdot (E_H - E_K) \qquad (5a)$$

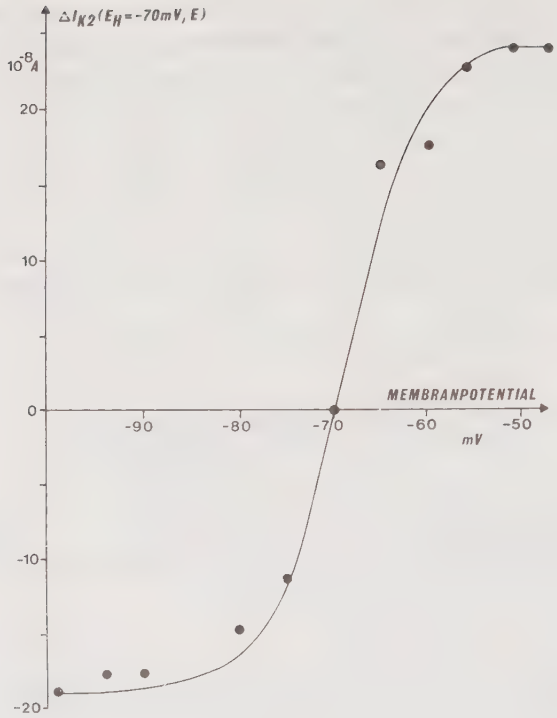


Abb. 2

In dieser Gleichung ist nun die treibende Kraft jeweils $(E_H - E_K)$. E_H wird während eines Experimentes nicht verändert; E_K kann als nahezu konstant angenommen werden, da die relativ kurzen Spannungspulse keine wesentliche Verschiebung des Kaliumgleichgewichtspotentials herbeiführen sollten, wenn man das Haltepotential in der Nähe des natürlichen Ruhepotentials wählt. Somit kann der Ausdruck $(E_H - E_K)$ als Konstante behandelt werden, die Strom-Spannungs-Beziehung in Abbildung 2 ist eine direkte Messung der Leitfähigkeitsänderungen, die durch die Pulse hervorgerufen werden, wenn man jeweils am Haltepotential mißt, und damit eine monoton wachsende, bijektive Funktion mit einer

oberen und einer unteren Grenze. In bezug auf das Haltepotential sind die Amplituden je nach Richtung der applizierten Pulse positiv oder negativ, eine Koordinatentransformation ist jedoch erlaubt, da es sich bei den gemessenen Strömen jeweils um die Differenz zweier Ströme handelt.

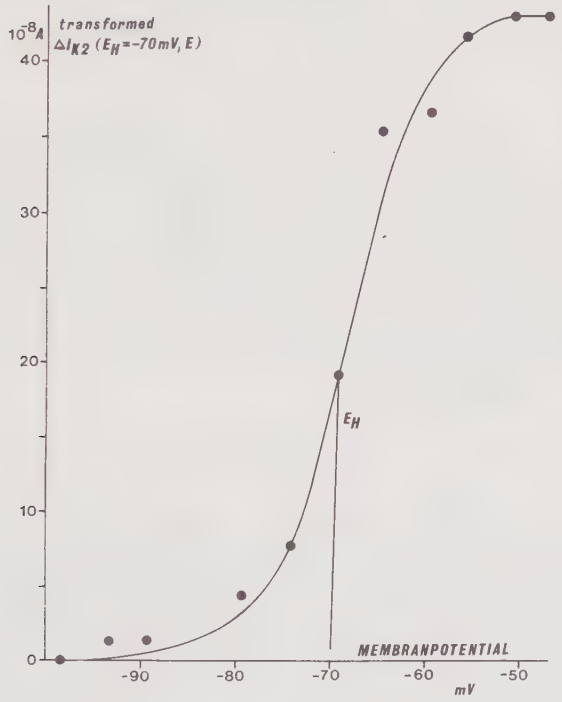


Abb. 3

Benutzt man die Kriterien der oberen und unteren Grenze für die Strom-Spannungs-Beziehung, wie sie in Abbildung 3 wiedergegeben ist, so kann Gleichung (5a) wie folgt geschrieben werden:

$$\Delta i_{K2}(t_\infty) = \left[s(E_H) - s(E)\right] \cdot f_{K2}(E_H, E_K) \cdot (E_H - E_K) \qquad (6)$$

wobei der Wert von s zwischen 0 und 1 liegt. ($0 \leq s(e) \leq 1$)

s(E) ist dimensionslos und wird Grad der Aktivierung der langsamen Stromkomponente genannt. Das Produkt $f_{K2}(E_H,E_K) \cdot (E_H - E_K)$ stellt die Amplitude der Aktivierungskurve in Abbildung 3 dar, die zum Haltepotential E_H gehört.
Gleichung (6) kann auch in abgekürzter Form in der Terminologie von Noble und Tsien (1968) geschrieben werden:

$$i_{K2} = \overline{i_{K2}} \cdot s \qquad (7)$$

Hier drückt s wiederum den jeweiligen Aktivierungsgrad des Kaliumsystems bei einem bestimmten Haltepotential aus, während $\overline{i_{K2}}$ ("instantaneous current voltage relationship") die vollaktivierte Strom-Spannungs-Beziehung des Schrittmacherstromes für den gesamten Potentialbereich darstellt. Mit der Änderung des Membranpotentials ändert sich auch die Funktion $\overline{i_{K2}}$, welche für s = 1 ihr Maximum erreicht und dann als vollaktivierte Strom-Spannungs-Beziehung benannt wird.

Diese kann nach Noble und Tsien (1968) auf zwei verschiedenen Wegen ermittelt werden:

a) Der Quotient der zeitabhängigen Stromanteile $\triangle i_A$ und $\triangle i_B$ (siehe Abbildung 1) ist die sogenannte "rectifier ratio", die mit der maximalen Amplitude der Aktivierungskurve multipliziert die vollaktivierte Strom-Spannungs-Beziehung $\overline{i_{K2}}$ oder auch "rectifier function" ergibt.

b) Die maximalen Amplituden verschiedener Aktivierungskurven bei verschiedenen Haltepotentialen ergeben gegen die jeweiligen Potentiale aufgetragen ebenfalls $\overline{i_{K2}}$.

Eine weitere Möglichkeit, $\overline{i_{K2}}$ zu erhalten, ist im Anhang II dargestellt.

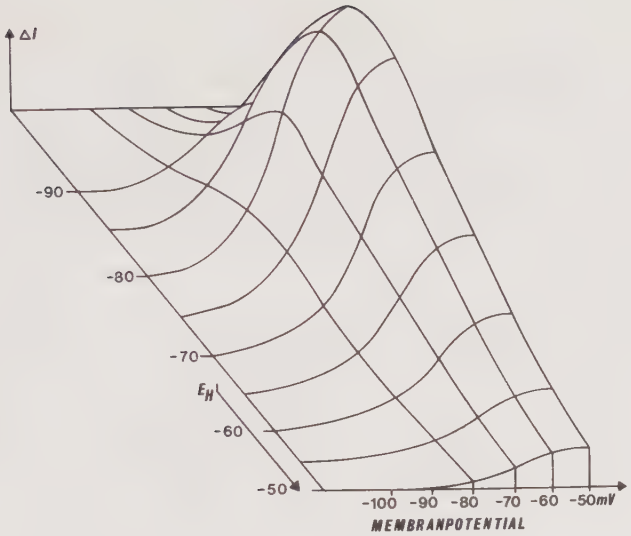


Abb. 4

Abbildung 4 zeigt in einer dreidimensionalen Darstellung die verschiedenen Strom-Spannungs-Beziehungen ($\overline{i_{K2}}$) in Abhängigkeit vom Haltepotential E_H und der jeweiligen Aktivierung s. Die größte Kurve bildet die vollaktivierte Strom-Spannungs-Beziehung, die "rectifier function", für die s = 1 ist.

Während einer rechteckigen Spannungsklemme vom Haltepotential E_H aus zu einem Klemmpotential E werden die in Abbildung 5 dargestellten Situationen 1 bis 4 durchlaufen.

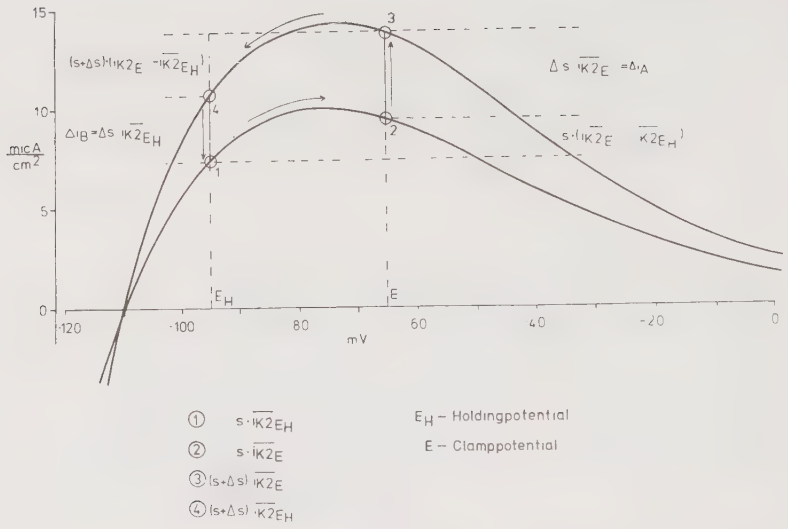


Abb. 5

Punkt 1 liegt auf der zum Haltepotential E_H gehörenden Funktion. Sofort nach der Spannungsklemme erfolgt ein Stromsprung zu Punkt 2, da sich bis jetzt nur die treibende Kraft (driving force) geändert hat. Von hier aus wächst die gesamte Funktion (siehe Abbildung 4) zeitabhängig mit dem Aktivierungsgrad ($s \longrightarrow s + \triangle s$), so daß nach dem langsamen Stromfluß $\triangle i_A$ der Punkt 3 erreicht wird. Bei der Rückkehr der Spannung zum Haltepotential ändert sich wiederum die treibende Kraft sofort, der Aktivierungsgrad jedoch nur zeitabhängig, wie $\triangle i_B$ zeigt. Deshalb wird Punkt 4 sofort nach der Rückkehr zum Haltepotential erreicht, während sich die gesamte Funktion erst mit der Änderung des Aktivierungsgrades - dem Ablauf von $\triangle i_B$ - wieder in ihrer alten Lage einfindet, so daß nun wieder Punkt 1 erreicht wird.

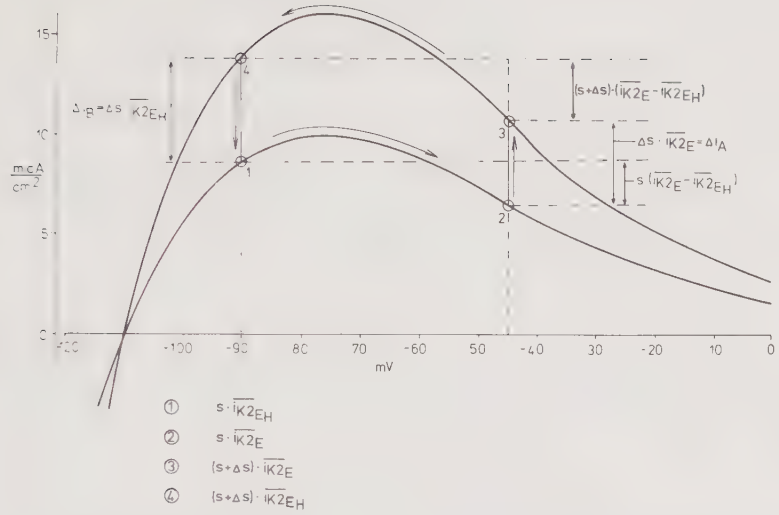


Abb. 6

Die gleiche Sequenz ist in Abbildung 6 dargestellt, nur daß hier das Klemmpotential in wesentlich positiveren Regionen liegt. Begründet durch die einwärts gerichtete Gleichrichtung von $\overline{i_{K2}}$ liegt nunmehr Punkt 2 bei einem niedrigeren Strom als Punkt 1 und Punkt 3 bei einem niedrigeren als Punkt 4, wodurch eine Umkehrung der Richtung der schnellen Stromsprünge erfolgt.
Diese Stromsprünge sind als ein Teil des Schrittmachersystemes (i_{K2} - System) in den beobachteten $\Delta i_{inst.A}$ und $\Delta i_{inst.B}$ enthalten.
Formuliert man Gleichung (6) auch für Spannungssprünge von E_H (Haltepotential) nach E (Klemmpotential), so ergibt sich:

$$\Delta i_{K2}(t_\infty) = \left[s(E) - s(E_H)\right] \cdot f_{K2}(E,E_K) \cdot (E - E_K) \qquad (8)$$

Jede zeitabhängige Stromänderung kann also als Differenz zweier stationärer Ströme desselben Systems angesehen werden:
a) dem Strom zur Zeit $t = \infty$ am Klemmpotential E:

$$i_{K2}(E,t = \infty) = s(E) \cdot f_{K2}(E,E_K) \cdot (E - E_K) \qquad \text{und}$$

b) dem Strom zur Zeit t = 0 am Haltepotential E_H:

$$i_{K2}(E_H,t = 0) = s(E_H) \cdot f_{K2}(E_H,E_K) \cdot (E_H - E_K).$$

Da die Leitfähigkeit für den zeitabhängigen Strom ebenfalls vom jeweiligen Membranpotential abhängig ist:

$$g(E) = s(E) \cdot f_{K2}(E,E_K)$$

ist sie demnach das Produkt aus einem zeitabhängigen kinetischen Faktor, der einem gating Mechanismus unterliegt, und der "rectifier function", die die stationäre Leitfähigkeit darstellt.

Um den gesamten Strom zu beschreiben, muß jedoch auch der sofort verfügbare Stromanteil $i_{inst.}$ berücksichtigt werden. Der Strom beim Klemmpotential E kann daher folgendermaßen formuliert werden:

$$i(E) = i_{inst.}(E) + s(E) \cdot f_{K2}(E,E_K) \cdot (E - E_K) \qquad (9)$$

Die totale Stromänderung beim Zurückklemmen zum Haltepotential E_H ist demnach:

$$i(E_H \longrightarrow E) = i_{inst.}(E) + s(E) - f_{K2}(E,E_K) \cdot (E - E_K)$$
$$- i_{inst.}(E_H) - s(E_H) \cdot f_{K2}(E_H,E_K) \cdot (E_H - E_K) \qquad (10)$$

Subtrahiert man nun den zeitabhängigen Anteil vom Gesamtstrom, so erhält man den sofort verfügbaren Stromsprung:

$$\Delta i_{inst.A} = i_{inst.}(E) - i_{inst.}(E_H) + s(E_H). \left[f_{K2}(E,E_K) \cdot (E - E_K) - f_{K2}(E_H,E_K) \cdot (E_H - E_K)\right] . \qquad (11)$$

Dieser besteht seinerseits aus zwei Anteilen: Zum einen enthält er den sofort verfügbaren Teil von i_{K2} - im weiteren $i_{K2inst.}$ genannt -,der durch die plötzliche Änderung der treibenden Kraft bedingt ist (siehe Abbildungen 5 und 6) - zum anderen enthält er den gesamten Leckstrom, der bei der plötzlichen Membranpotentialänderung fließt und der in Anlehnung an die Terminologie von Noble und Tsien (1968) weiterhin i_{K1} genannt wird. Somit können diese beiden Stromänderungen getrennt werden.

$$i_{inst.}(E) - i_{inst.}(E_H) = \Delta i_{K1} = i_{K1}(E) - i_{K1}(E_H) \qquad (12)$$

und

$$\Delta i_{K2inst.} = s(E_H) \cdot \left[f_{K2}(E,E_K) \cdot (E - E_K) - f_{K2}(E_H,E_K) \cdot (E_H - E_K) \right] \qquad (13)$$

Eine einfachere Schreibweise - unter Benutzung des Terms $\overline{i_{K2}}$ - lautet:

$$\Delta i_{inst.A} = \Delta i_{K1} + s(E_H) \cdot \left[\overline{i_{K2}}(E) - \overline{i_{K2}}(E_H) \right] \qquad (11a)$$

Aus dieser Gleichung ist es unter anderem leicht möglich, Δi_{K1} aus den Stromsprüngen, die bei einer Spannungsklemme auftreten, zu berechnen, da nun der sofort verfügbare Teil des Schrittmachersystemes separiert werden kann.

Sicherlich enthalten auch andere zeitabhängige Stromsysteme sofort verfügbare - "instantaneous"-Anteile, die in i_{K1} enthalten sind; diese zu analysieren und im einzelnen von den Leckströmen zu separieren, stellt wohl die einzige Möglichkeit dar, das System i_{K1} - welche Ionen auch immer es tragen mögen - zu analysieren.

Das Schrittmachersystem

Wie aus der allgemeinen Theorie folgt, kann der Schrittmacherstrom vereinfacht mit Gleichung (7)

$$i_{K2} = \overline{i_{K2}} \cdot s$$

beschrieben werden. Der Aktivierungsgrad s dieses Stromsystemes wird aus der Überlegung abgeleitet, daß der Schrittmacherstrom durch einen einzigen "Hodgkin-Huxley gating Mechanismus" kontrolliert wird (Noble und Tsien, 1968), der sich seinerseits durch einen physiko-chemischen Prozeß beschreiben läßt:

$$s \underset{\beta}{\overset{\alpha}{\rightleftharpoons}} (1 - s) \qquad (14)$$

Hier beschreiben s und (1 - s) die statistische Verteilung der offenen und geschlossenen gating Partikel.
Es wird allgemein angenommen, daß es sich hierbei um eine Reaktion erster Ordnung handelt:

$$\frac{ds}{dt} = \alpha \cdot (1 - s) - \beta \cdot s \,, \qquad (15)$$

deren Gleichgewicht ds/dt = 0 durch

$$s_{\infty} = \frac{\alpha}{\alpha + \beta} = \alpha \cdot \tau^{-1} \qquad (16)$$

angegeben werden kann.

τ gibt die Zeitkonstante der Reaktion an und somit stellt τ^{-1} die Geschwindigkeitsfunktion der Reaktion dar.

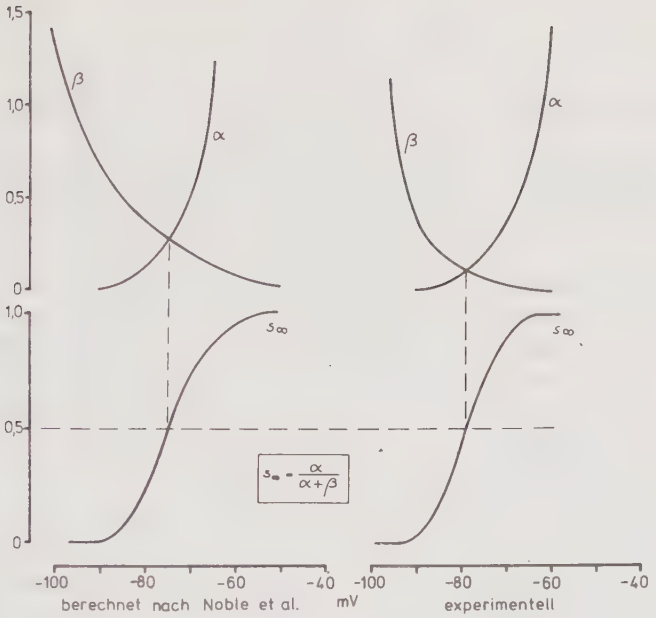


Abb. 7

Da und für sich betrachtet die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion einer allgemeinen physiko-chemischen Reaktion der Gestalt

$$\alpha = k_{Hin} = A \cdot e^{-\frac{\Delta E_1}{RT}} \qquad (17)$$

$$\beta = k_{Rück} = A \cdot e^{-\frac{\Delta E_2}{RT}} \qquad (18)$$

repräsentieren, muß der Quotient $\ln \alpha / \beta$ die Geschwindigkeitskonstante der den gating Mechanismus konstrollierenden Reaktion darstellen.
Dieser Quotient wurde von Noble und Tsien als

$$\ln \frac{\alpha}{\beta} = \frac{E - E_H}{k} \qquad (19)$$

angegeben, wobei k die Steilheit der Funktion angibt.

Beeinflußt man nun auf eine beliebige Art und Weise den Schrittmacherstrom bzw. den ihm zugrunde liegenden Mechanismus, so muß dies eindeutig ablesbar sein:

1) an der Spannungsabhängigkeit seiner Aktivierungskurve s_∞,
2) an der Steilheit dieser Funktion,
3) an der Spannungsabhängigkeit seiner Geschwindigkeitskurve bzw. der sie bestimmenden Funktionen α und β,
   (Hier sollte eine Verschiebung des Gleichgewichtes der chemischen Reaktion bzw. des gating Mechanismus an der Änderung des Quotienten $\ln \alpha/\beta$ ablesbar sein.)
4) an einer Änderung der vollaktivierten Strom-Spannungs-Beziehung $\overline{i_{K2}}$, die gleichbedeutend wäre mit einer Änderung der verfügbaren Kaliumkanäle (bzw. Änderung der negativen Steigung oder der einwärts gerichteten Gleichrichtung).

Der Schrittmacherstrom bietet also gerade dadurch, daß er über eine solche Kinetik verfügt, die Möglichkeit, die Art seiner Beeinflussung genau zu analysieren.

METHODEN

Die hier präsentierten Experimente wurden mit einer Methodik erarbeitet, welche sich sehr an die bereits durch Noble und Tsien (1968) sowie Hauswirth, Noble und Tsien (1968) vorgestellte anlehnt. - Lediglich erfolgten technische Verbesserungen - so im elektronischen Bereich, wo die Anlage dem inzwischen weit höheren Stand der Technik angepaßt wurde, oder auch im Bereich der Flüssigkeitssysteme, wo ein rauhes und exaktes Umschalten von einem auf ein anderes System nunmehr leicht möglich ist.

Präparate:

Es wurden ausschließlich Purkinje Fasern aus Schafsherzen als Präparate verwendet, da nahezu alle vorliegenden Arbeiten zum Schrittmacherstrom an diesen Präparaten erarbeitet wurden, ein Vergleich der Ergebnisse somit leicht möglich sein sollte.

Die Schafsherzen wurden im Schlachthaus der Firma Kind, Grevenbroich, sofort nach der Tötung (ca. 5 bis 1o sec) aus den Tieren herausgelöst, also nicht etwa erst nach der üblichen Schlachtprozedur.

Hierauf wurden die Ventrikel geöffnet und mit einer o,9%igen Kochsalzlösung gespült, damit keine Blutgerinsel in diesen verblieben. Eine auf ungefähr 1o° C vorgekühlte Tyrode Lösung - ca. 2 l für zwei Herzen - diente zum Transport der Herzen von Grevenbroich nach Bonn, der normalerweise 4o min. dauerte.

Die Purkinje Fasern wurden danach aus beiden Ventrikeln so präpariert, daß ihre Länge nicht mehr als eine Längenkonstante (1-2 mm, Weidmann, 1952) ausmachte. Damit die Enden der präparierten Faserstücke heilten, wurde eine Zeit von einer Stunde mehr als ausreichend angesehen (Deleze, 197o). In dieser Zeit wurden die Fasern in einer oxygenierten Tyrode Lösung bei ca. 35-36° C aufbewahrt. Die gleiche Lösung bildete auch stets die Grundlage in allen Stadien der Experimente, die Temperatur wurde jeweils im oben angegebenen Bereich gehalten, eine permanente Versorgung mit Sauerstoff war gewährleistet, eventuelle

Pharmaka wurden dieser Lösung zugegeben. Im einzelnen setzte sich die verwendete Tyrode Lösung wie folgt zusammen: Na^+: 148,3mMol, K^+: 4,o mMol, Ca^{++}: 1,8 mMol, Mg^{++}: o,5 mMol, Cl^-: 144,6 mMol, HCO_3^-: 12,o mMol, $H_2PO_4^-$: o,35 mMol, Glucose: 2g/1. Der pH-Wert stellte sich bei einer Belüftung der Lösung mit einem Gemisch aus 95 % O_2 und 5 % CO_2 auf 7,4 bis 7,45 ein.

Voltage Clamp Anlage

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde eine Anlage eingesetzt, die es erlaubt, die von Deck, Kern und Trautwein (1964) eingeführte voltage clamp Technik mit zwei Mikroelektroden zu verwenden.

Einen Überblick über die gesamte Anlage sollen die Abbildungen 8 und 9 erlauben.

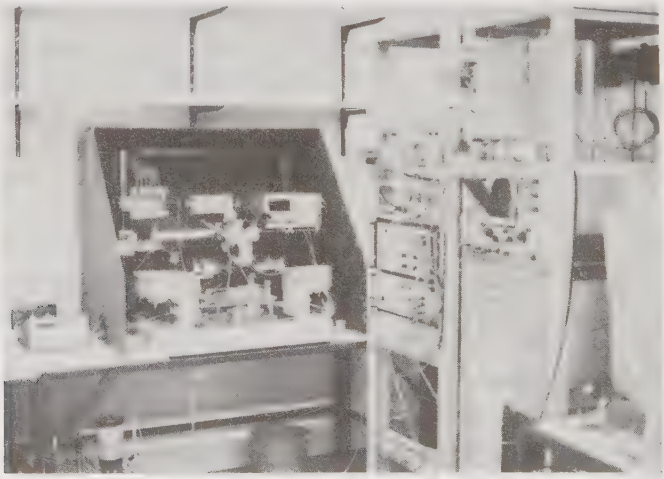
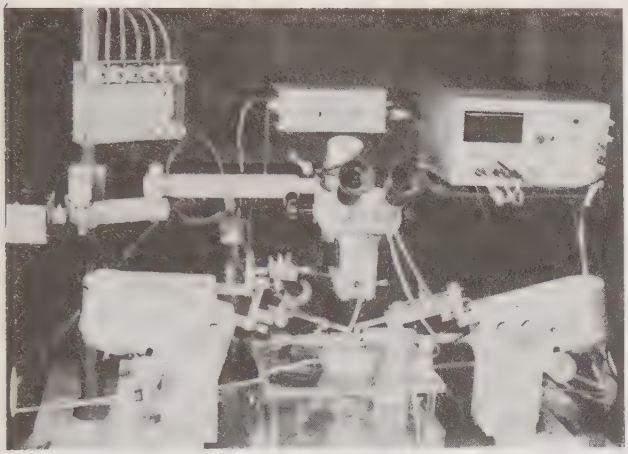


Abb. 8



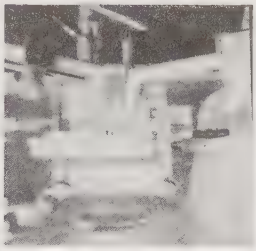


Abb. 9

a) Das Bad:

Als Bad diente eine Perspex Kammer von ca. o,8 ml Inhalt, welches zur Heizung in einem zweiten Heizbad montiert war, in welchem auch die Lösung durch ein längeres Leistungssystem im vorbestimmten Temperaturbereich gehalten werden konnte.

Diesem Bad lag eine Konstruktion zugrunde, welche 1968 von Tony Spindler, Oxford, für das Labor von Dr. Denis Noble entwickelt wurde. Abbildung 1o zeigt die Originalkonstruktion von Spindler.

Als Ergänzung dazu baute Herr Mondt, Bonn, die beiden Stimulationselektroden so um, daß diese über zwei Schubstangen (ähnlich dem Mechanismus an Dampflokomotivrädern) so bewegt werden konnten, daß die Fasern durch diese Elektroden im Bad gehalten wurden.

Die beiden Halbzellen für die äußere Lösung als auch die beiden Halbzellen, die gleichzeitig die Halterung für die Mikroelektroden darstellten, waren mit Agar gefüllt, der eine elektrische Leitung über nichtpolarisierbarem Silber / Silberchlorid ermöglichte.

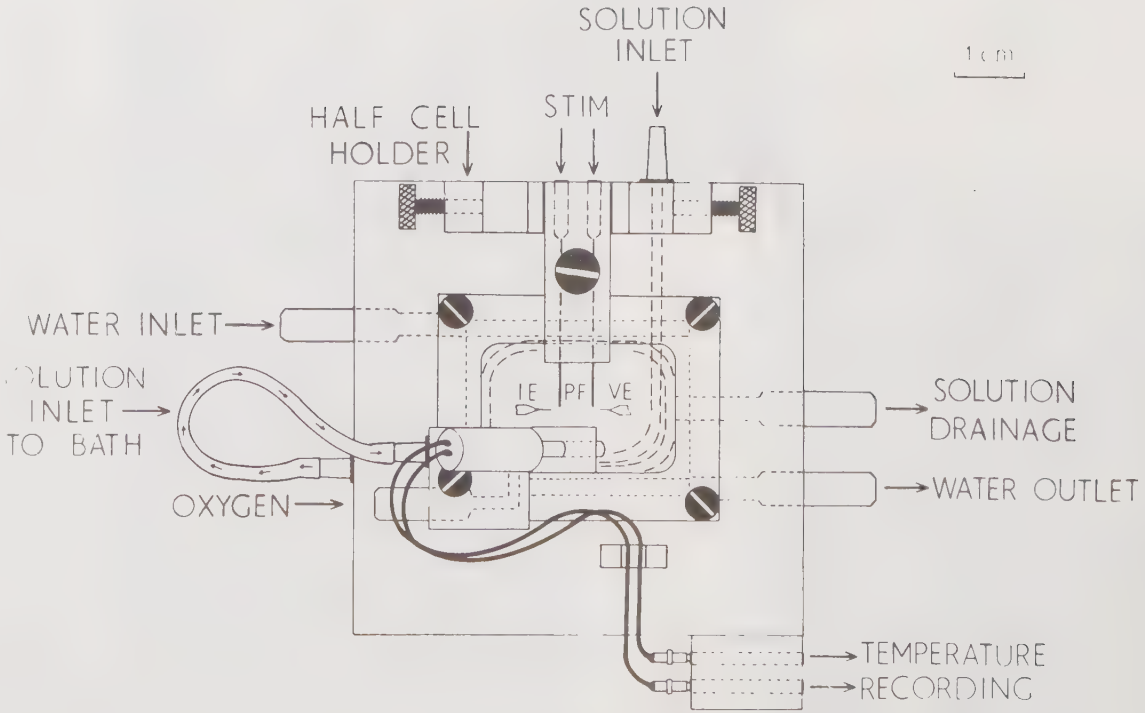

SOLUTION
INLET
1 cm
HALF CELL
HOLDER
STIM
WATER INLET
SOLUTION
INLET
TO BATH
OXYGEN
IE
PF
VE
SOLUTION
DRAINAGE
WATER OUTLET
TEMPERATURE
RECORDING

Abb. 1o

b) Das Flüssigkeitssystem:

Da für die Experimente am Schrittmachersystem nicht nur in reiner Tyrode Lösung gearbeitet sondern diese auch mit den verschiedensten Pharmaka versetzt werden mußte, kam es wesentlich darauf an, eine Methodik zu entwickeln, welche es erlaubt, eine Badlösung sehr schnell und möglichst vollständig gegen eine andere auszutauschen. Das in Abbildung 11 dargestellte System ist in der Lage, sechs Lösungen gleichzeitig vorrätig zu halten. Eine Lösung kann nunmehr durch Unterdruck (Wasserstrahlpumpe) sofort aus dem Zufuhrsystem entfernt werden, eine zweite in das Vorratssystem gesaugt und in das Bad gegeben werden.

Der Austausch der Lösungen im Bad benötigt sodann bei einem angenommenen Maximalvolumen von einem ml und einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 2o Tropfen pro Minute im Vorratssystem (Abb. 12) eine Zeit von 18o sec, um nach der in Abbildung 12 dargestellten Gleichung zu 95 % vollzogen zu werden. Ein noch schnellerer Austausch war nicht möglich, da dann zu starke Strömungen im Bad entstünden, die das Verbleiben der eingeheilten Mikroelektroden in der Faser gefährdeten.

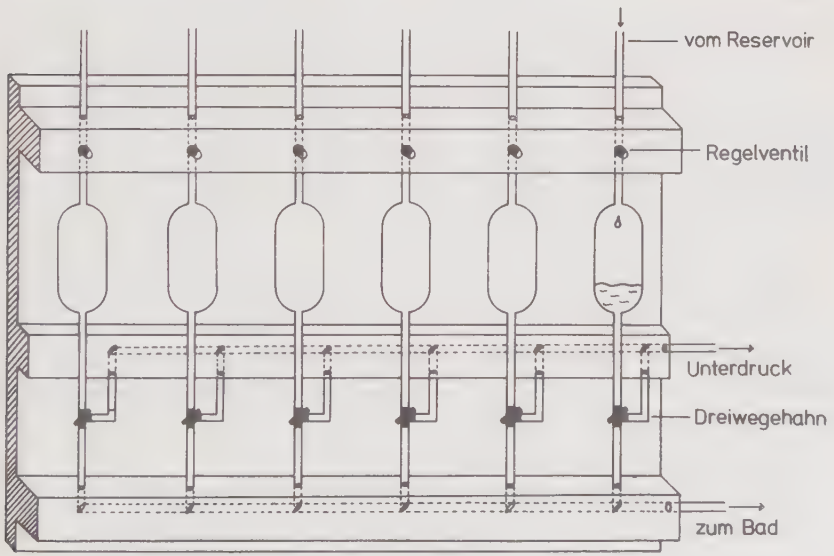


Abb. 11

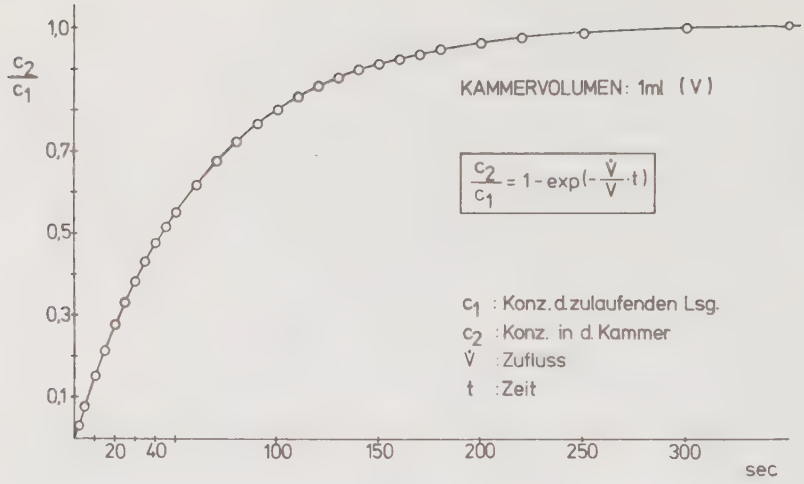


Abb. 12

Die Lösung floß aus dem Bad in einen kleinen Perspex-Zylinder, nachdem sie einen Siphon passiert hatte, dessen Austrittsrohr mit einem dreieckigen Stück Filterpapier versehen war, so daß jeder durch sein Eigengewicht abfallende Tropfen einen nächsten nach sich zog. Dieses Austrittsrohr war in der Höhe über ein feines Gewinde so verstellbar, daß der Kammerinhalt und somit der Flüssigkeitsspiegel sehr genau durch die Stellung dieses Gewindes geregelt werden konnte.

c) Die elektronische Anlage:

Grundsätzlich wurden die Experimente mit der von Deck, Kern und Trautwein (1964) entwickelten voltage clamp Technik durchgeführt, deren systematische Anwendung durch Noble und Tsien (1968) auf den Schrittmacherstrom erfolgte.

Die intrazellulären Mikroelektroden waren gefüllt mit einer 3 molaren Kaliumchloridlösung und wiesen einen Widerstand von

1o bis 2o MΩ auf.

Die stromfütternde Mikroelektrode wurde in der Mitte zwischen den beiden abgeschnittenen Enden der Faser eingestochen, die spannungsmessende ca. 3oo µm davon entfernt.

Abbildung 13 beschreibt die voltage clamp Anlage im Detail. Die Eingänge der intrazellulären Spannungselektrode und der Referenzelektrode im Bad waren Teil eines integrierten Schaltkreises 1 und 2 (ICL 8oo7, Intersil) mit Feld-Effekt-Eingängen (R_{in} = $1o^{12}$ Ω), die als Spannungsfolger geschaltet wurden (Impedanzwandler).

Das Signal wurde in einem zusätzlichen Verstärker 3 (ICL 8oo7, 741 Typ) zu einem endgültigen Signal mit einem Ausgangsverhältnis von 1 : 1 vergrößert, welches dann mit verschiedenen Geräten aufgezeichnet wurde.

Im einzelnen wurden für die Aufzeichnung benutzt:

1 Tektronix R 51o3N storage Oscilloscop,
1 Tektronix 565 Oscilloscop mit angeschlossener Kamera der Firma Grass
1 Brush - Gould 4 - Kanal - Schreiber sowie
1 Bell & Howell Tonbandgerät TR 32oo mit eigener Hinterbankontrolle durch ein drittes Oscilloscop.

Am Verstärker 4 (ICL 8oo7, 741 Typ) konnte die Verstärkung und ebenso die Frequenz der Antwort des Schaltkreises frei gewählt werden. Die Ausgangsspannung wurde über einen elektronischen Doppelschalter mit einem stromfütternden Verstärker (Analog devices AD 171 J) verbunden, der über einen maximalen Ausgangsspannungsbereich von ± 1oo V verfügte und über einen stufenweise wählbaren Serienwiderstand (2o bis 5o MΩ) mit der stromfütternden Mikroelektrode verbunden war.

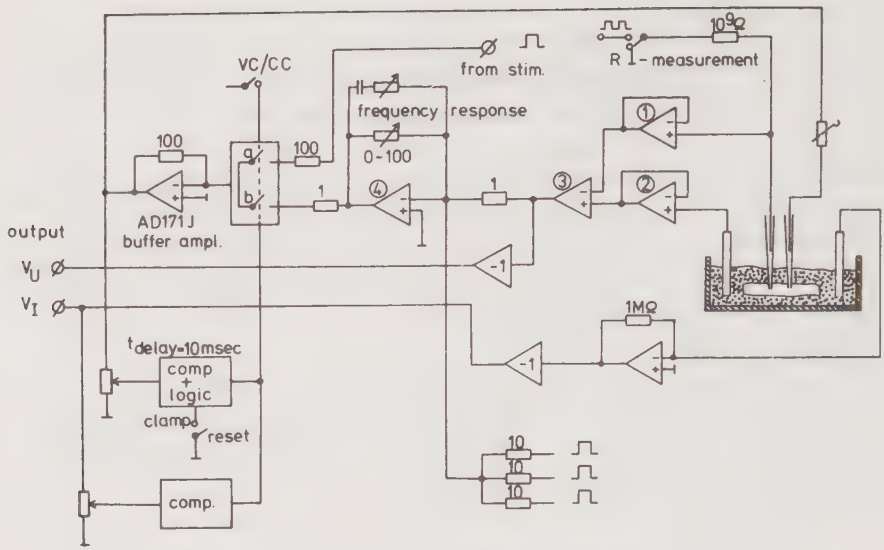


Abb. 13

Schutz der Faser

Die Faser wurde in ähnlicher Weise elektronisch kontrolliert, wie dies durch Tsien (1974a) beschrieben wurde:

1) Schutz gegen zu große Ströme:
Ein Komparator (ICL 8001 plus Logik), dessen Schwelle frei zu wählen war, maß die Spannung proportional zum gefütterten Strom. Wurde ein vorgewählter Bereich erreicht (z.B. während eines kapazitiven spikes), so wurde der stromfütternde Kreis automatisch unterbrochen, bis die gemessene Spannung sich ausreichend vermindert hatte. Hierauf wurde der Kreis erneut automatisch wieder geschlossen.
Dadurch blieb der Strom, der zur Aufladung der Membrankapazität in die Faser gefüttert werden mußte, in einem vorher gewählten Bereich, ohne so stark anzuwachsen, daß die Faser geschädigt oder die Mikroelektrode zerstört wurde (z.B. Ko-

chen der Kaliumchloridlösung).

2) Schutz gegen Überspannungen:
In einer ähnlichen Schaltung maß ein zweiter Komparator (ebenfalls ICL 8001 plus Logik) die Spannung am Ausgang des stromfütternden Verstärkers. Wurde eine vorgegebene Schwelle erreicht, so unterbrach wiederum ein elektronischer Schalter (IM 5018) - kontrolliert durch eine eigene Logik - den Rückkopplungsverstärkerkreis. Diese Unterbrechung erfolgte jedoch nur, wenn die Überspannung länger als 100 msec dauerte. Kürzere Stromspitze - wie kapazitive spikes - wurden durch diese Schaltung nicht beeinflußt.
Die Schalter a und b blieben stets offen,bis die Rückkopplungsschleife oder die Applikation rechteckiger Stromstöße von Hand angeschaltet wurden. Dadurch wurde verhindert, daß die Ausgangsspannung am stromfütternden Verstärker durch einen Zusammenbruch des Spannungsmeßkreises (z.B. durch Herauskommen der Mikroelektrode aus der Faser oder gar ihr Abbrechen) außer Kontrolle geriet, was eine Zerstörung der Faser zur Folge gehabt hätte.

Mögliche Fehler

Der häufigste Fehler bei dieser Art Experimente dürfte ein Driften der Spannung sein, das auf Veränderungen der Position der Mikroelektrode in der Faser oder Änderungen ihres Widerstandes zurückzuführen ist.

Bei den vorliegenden Experimenten wurde ein Spannungsdrift von ca. 2 bis 4 mV über mehrere Stunden festgestellt. Grundsätzlich konnte durch eine entsprechende elektronische Schaltung der Widerstand der Mikroelektrode zu jeder Zeit kontrolliert werden. Außerdem wurden die entsprechenden Eichdaten zu Beginn und am Ende eines jeden Experimentes streng miteinander verglichen. Nur bei nahezu exakter Übereinstimmung wurden die experimentellen Daten zur Auswertung verwendet.

Es ist allgemein unbestritten, daß es unmöglich ist, uniforme Spannungsklemmen am Herzmuskel während des schnellen Natriumstromes zu erhalten (Sommer und Johnson, 1968; Mobley und Page, 1972; McGuigan, 1974; Connor, Barr und Jacobson, 1975; Jacobson, Barr und Connor, 1975).

In Purkinje Fasern resultieren aus ihrer relativ großen Ausdehnung (1 bis 2 mm) und dem hohen Widerstand der Mikroelektroden (ca. 1o M) weitere Schwierigkeiten (Deck, Kern und Trautwein, 1964; McAllister und Noble, 1966; Johnson und Liebermann, 1971). Jedoch sind diese Schwierigkeiten weit weniger ernst im Fall des relativ langsamen i_{K2}-Auswärtsstromes (Tsien, 1974; Mobley und Page, 1972).

RESULTATE

Der Schrittmacherstrom und Alpharezeptoren

Adrenalin verschiebt die Aktivierungskurve (s_∞) des Schrittmacherstromes um ca. 2o mV in die depolarisierende Richtung (Hauswirth, Noble und Tsien, 1968; Tsien, 1974a, b; Hashimoto, Hauswirth und Ziskoven, 1975; Hauswirth, Wehner und Ziskoven, 1976). Sollte dieser Effekt auf der Mitwirkung von Alpharezeptoren beruhen, die von Cranefield, Hoffman und Wit (1971) auch in Purkinje Fasern nachgewiesen wurden, so müßte ein Alpharezeptorenstimulator den gleichen oder doch zumindest einen ähnlichen Einfluß haben wie Adrenalin. Aus diesem Grunde wurde nach einer vollständigen Analyse des Schrittmacherstromes i_{K2} unter Normalbedingungen eine Purkinje Faser mit Methoxamin versetzt. Dieses Präparat wurde gewählt, da Methoxamin nicht nur ein ausgesprochen guter Alphastimulator ist sondern außerdem auch betablockierende Eigenschaften hat. - Sollte die Alphawirkung von Methoxamin keinen Einfluß auf den i_{K2}-Strom haben, so wäre an diesem System nicht eindeutig nachzuweisen, daß das Präparat die Membran der Faser tatsächlich erreicht hat. Die ihm eigene betablockierende Wirkung sollte jedoch eine weitere nachträgliche Adrenalinwirkung verhindern können.

Abbildung 14 zeigt einen Ausschnitt der Originalaufzeichnungen während eines voltage clamp-Experimentes - ausgehend von einem Haltepotential von -7o mV: Nach einer depolarisierenden Spannungsklemme auf -4o mV und darauffolgender Rückkehr zum Haltepotential wurde eine hyperpolarisierende Klemme auf -8o mV und anschließender Rückkehr zum Haltepotential appliziert. Eine Veränderung der einzelnen Ströme war nicht zu beobachten.

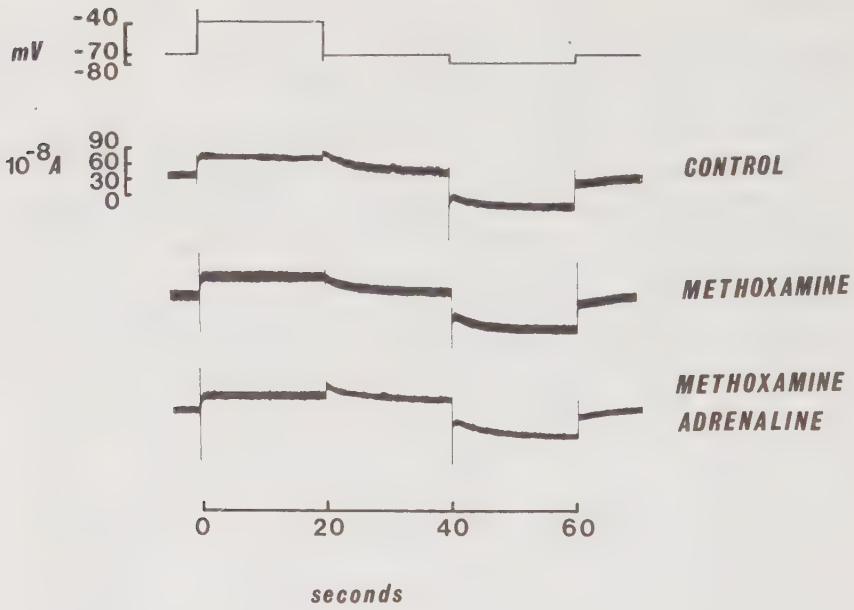


Abb. 14

Die Aufnahme der gesamten s_∞-Kurve (Abbildung 13) in tatsächlichen Strömen sowie auch in normierter Form ($s_{max} = 1$) (Abbildung 16) zeigten keinerlei Veränderung der Kinetik. Methoxamin hatte die Membran erreicht, da eine nachträgliche Adrenalingabe keine betastimulierende Wirkung mehr besaß.

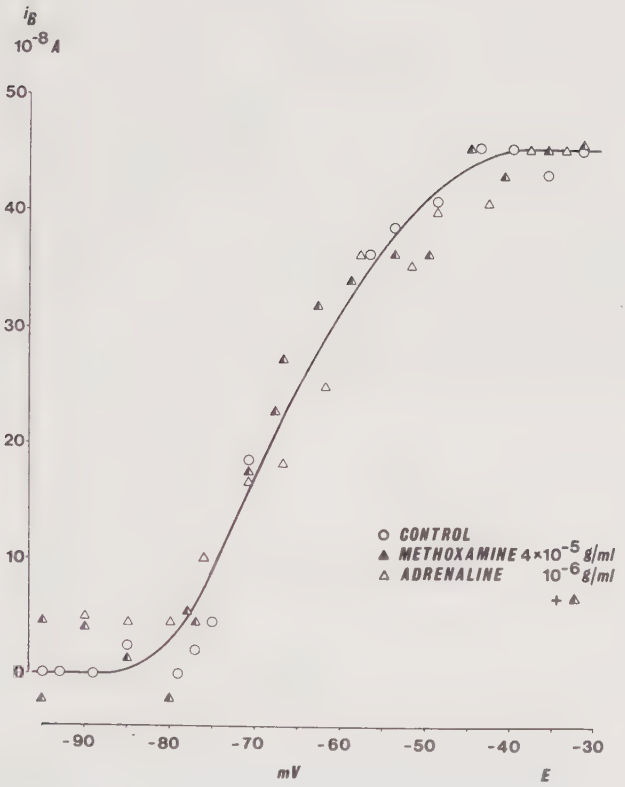

i_B
10^{-8} A
50
40
30
20
10
0
-90
-80
-70
-60
-50
-40
-30
mV
E
CONTROL
METHOXAMINE 4×10^{-5} g/ml
ADRENALINE 10^{-6} g/ml

Abb. 15

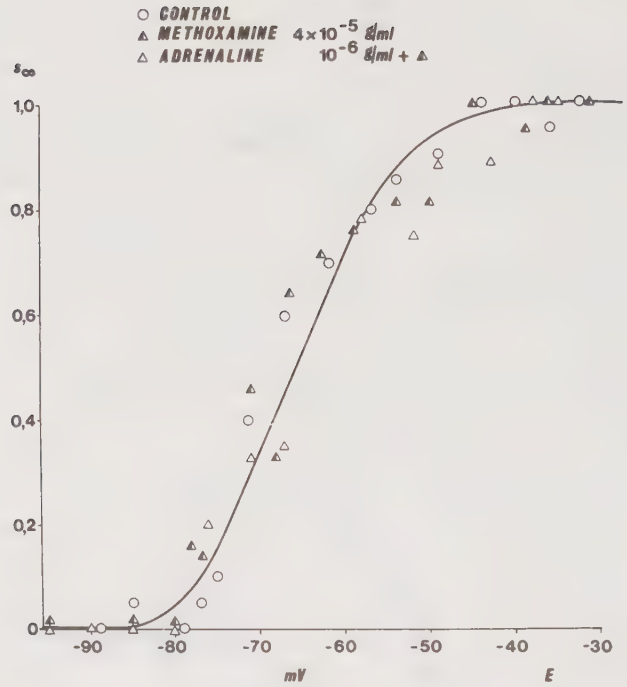
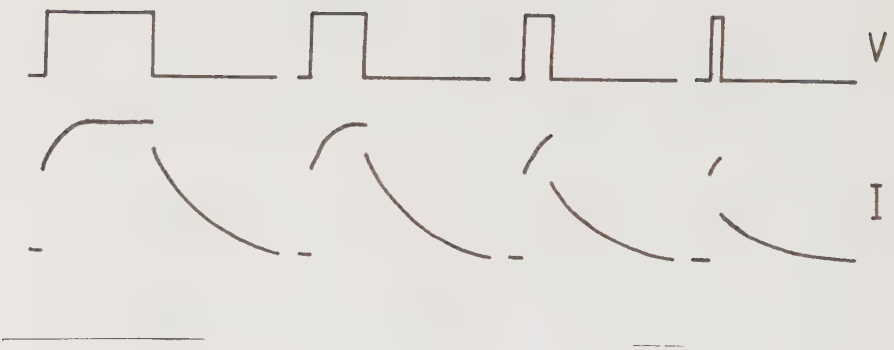


Abb. 16

Lediglich die Originalaufnahmen des gesamten Experimentes zeigten eine leichte Verschiebung des Ruhepotentials der Faser von -76 mV nach -72 mV unter dem Einfluß von Methoxamin. Ebenso wurde eine Verringerung der Anstiegssteilheit des Aktionspotentials festgestellt (siehe auch Cranefield, Hoffman und Wit, 1971), was jedoch vielleicht auch mit der leichten Depolisierung der Membran zu erklären wäre. Weidmann (1955) beschrieb mit der Aufnahme der h_∞-Kurve eine 25%ige Verminderung der Anstiegssteilheit bei einer Depolarisierung in der Größenordnung, wie sie hier beobachtet wurde. Um eine Geschwindigkeitskurve (τ^{-1}) in einem größeren Bereich zu bestimmen, ist es notwen-

dig, in positiveren Regionen ein Verfahren zu benutzen, das von Noble und Tsien (1968) "envelope test" genannt wurde, da hier die Zeitkonstanten am Klemmpotential so klein sind, daß eine exakte Bestimmung von τ nicht möglich ist. Außerdem können in positiveren Regionen auch andere Stromsysteme beteiligt sein - wie z.B.der i_x-Strom. Dies ergäbe dann eine zusammengesetzte Stromkurve, die im "envelope test" als doppelt logarithmisch zu erkennen wäre. Hier ist es auch möglich, die beiden Stromkomponenten klar voneinander zu trennen.

Abbildung 17 zeigt einen solchen "envelope test", bei dem Klemmen vom Haltepotential bei -71 mV nach -36 mV und zurück appliziert wurden, wobei die Dauer der Klemmen zunehmend verringert wurde. Die Amplituden beim Zurückklemmen zum Haltepotential wurden halblogarithmisch gegen die Dauer der Klemmen aufgetragen; die Steilheit der resultierenden Geraden stellte die Zeitkonstante τ dar.



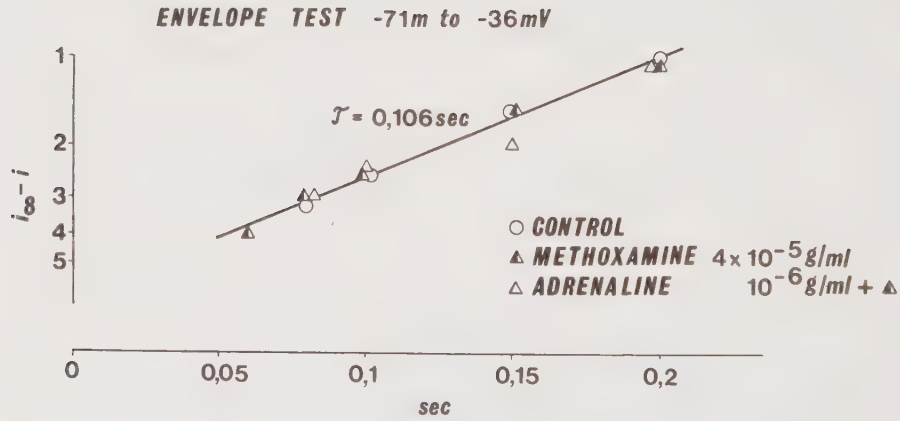


Abb. 17

Die Darstellung der Geschwindigkeitskurve in Abbildung 18 zeigt ebenfalls keine Änderung der Kinetik über den gesamten Potentialbereich.

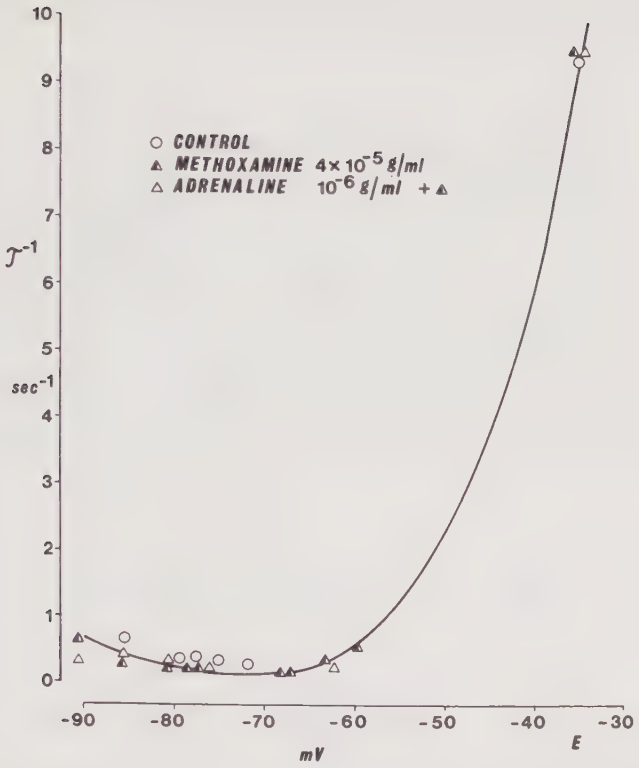


Abb. 18

Da sich der Schrittmacherstrom aus $i_{K2} = s \cdot \overline{i_{K2}}$ zusammensetzt, sollte auch der zweite Faktor, die vollaktivierte Strom-Spannungs-Beziehung, untersucht werden. Sie zeigt normalerweise eine ausgeprägte negative Steigung - "negative slope" - in positiveren Spannungsbereichen sowie eine einwärts gerichtete Gleichrichtung (vergleichbar dem nichtlinearen Teil der Strom-Spannungs-Kennlinie einer Diode).

Beide Eigenschaften wurden weder von Methoxamin noch von der zusätzlichen Adrenalingabe verändert. Die Kurve blieb außer-

dem auch in ihrer Höhe unverändert, was bedeutet, daß keine Änderung in der Anzahl der Kaliumkanäle in der Membran eintrat (Abbildung 19).

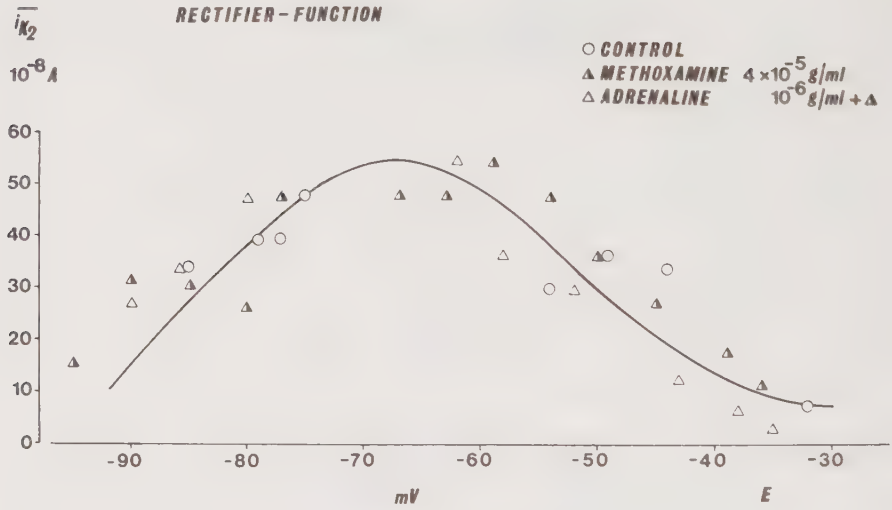


Abb. 19

Diese Ergebnisse schließen eindeutig die Beteiligung von Alpharezeptoren bei der Steuerung des Schrittmachersystemes aus. Es ist dies ein Hinweis darauf, daß i_{K2} über Betarezeptoren gesteuert wird. Daher ist es auch nicht verwunderlich, wenn selektive Alphastimulatoren keinen positiv chronotropen Effekt am Herzmuskel haben.

Lokalanästhetika sowie lokalanästhetische Nebenwirkungen vieler Betarezeptorenblocker sind auf den Schrittmacherstrom ohne Einfluß

Da viele betablockierende Substanzen einen lokalanästhetischen Nebeneffekt besitzen, sollte eindeutig geklärt werden, ob dieser Effekt für die Wirkung der Betablocker auf die Kinetik des Schrittmacherstromes verantwortlich ist. Dazu wurde, wie Abbildung 2o als ein Auszug aus den Originalaufnahmen der voltage clamp-Untersuchung zeigt, wiederum zuerst eine gesamte Analyse des Schrittmachersystems unter Kontrollbedingungen und danach der bekannten Wirkung von Adrenalin durchgeführt. Nach Zugabe eines Lokalanästhetikums (Prokain) wurde sodann noch ein Betablocker (Atenolol) eingesetzt, der selbst keine lokalanästhetische Wirkung hat.

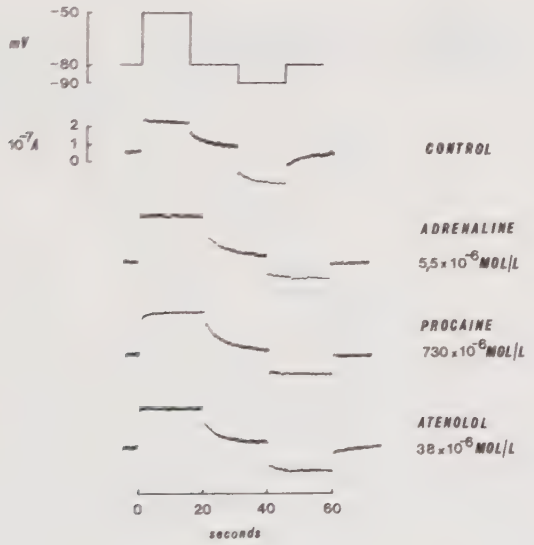


Abb. 2o

Abbildung 2o zeigt bei einer typischen Klemmfolge - ausgehend von einem Haltepotential bei -8o mV - die bekannten Wirkungen von Adrenalin: der Strom bei der Rückkehr zum Haltepotential nach einer depolarisierenden Klemme auf -5o mV war in seiner Amplitude vergrößert und etwas verlangsamt, nach hyperpolarisierender Klemme auf -9o mV war eine Zeitabhängigkeit nicht mehr zu erkennen. Außerdem wurde der stationäre Strom am Haltepotential in die Einwärtsrichtung verschoben, wie es bereits von Hauswirth, Noble und Tsien (1968) beschrieben worden ist. Nach zusätzlicher Gabe von Prokain war keine Änderung feststellbar, erst die Applikation von Atenolol beschleunigte den zeitlichen Ablauf der Ströme wieder und verringerte auch die Amplitude der Ströme bei der Rückkehr zum Haltepotential nach Depolarisation. Ebenso erschien nunmehr wieder eine Zeitabhängigkeit des Stromes nach Hyperpolarisation.

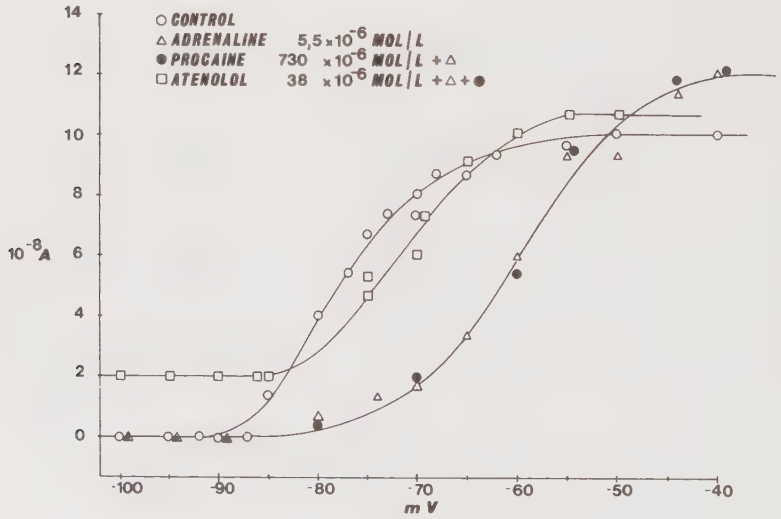


Abb. 21

Abbildung 21 zeigt die Abhängigkeit des Aktivierungsgrades des Schrittmacherstromes vom Membranpotential (s_∞-Kurve). Gemessen wurden die Ströme bei der Rückkehr zum Haltepotential unter Bedingungen, wie sie oben beschrieben wurden.

Adrenalin verschob - wie erwartet (Hauswirth, Noble und Tsien, 1968; Tsien, 1974a; Hashimoto, Hauswirth und Ziskoven, 1975, 1977; Hauswirth, Wehner und Ziskoven, 1976, 1977) - die Kurve in die depolarisierende Richtung. Prokain änderte an dieser Situation nichts, eine Wirkung des Lokalanästhetikums war nicht nachweisbar. Der Betablocker Atenolol jedoch verschob die Kurve wiederum in die hyperpolarisierende Richtung, obwohl die ursprüngliche Position der Kurve mit der hier verwendeten Konzentration nicht ganz erreicht werden konnte.

Eine zusätzliche Information wurde mit der Normierung der Kurve gewonnen (Abbildung 22): Die s_∞-Funktion besaß unter der Wirkung von Adrenalin nicht mehr die gleiche Steilheit wie unter Kontrollbedingungen oder zusätzlicher Betablockade.

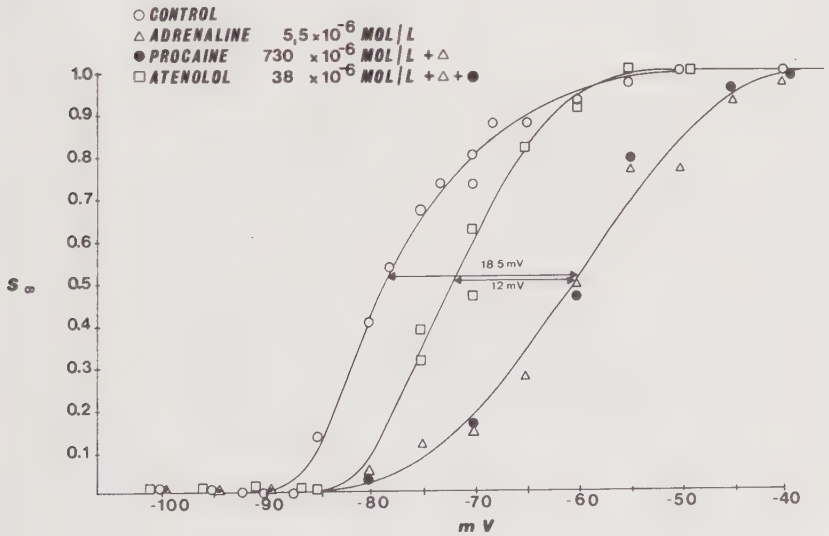


Abb. 22

Dies widersprach zwar den Ergebnissen von Tsien (1974a, b), der eine steilere Kurve nach Adrenalingabe beschrieb, doch erwies sich dieser Effekt in späteren Experimenten als sehr uneinheitlich. Abbildung 4o zeigt ebenso wie Tsien's Ergebnisse eine steilere s_{∞}-Kurve unter Adrenalin; Hauswirth, Noble und Tsien (1968) fanden dagegen keinerlei Änderung der Steilheit.

Tabelle 1 beinhaltet eine ausführlichere Zusammenstellung der wesentlichen Daten einiger repräsentativer Experimente, die dieser Arbeit zugrunde liegen.

Tabelle 1

Elektrophysiologische Parameter von Aktionspotentialen und voltage clamp Strömen in Purkinje Fasern

Exp.-Nr.	Bedingungen	RP(mV)	APD(ms)	HP(mV)	V_h(mV)	s_∞ (mV)	Verschiebung$_1$ von $\frac{}{k}$
34-3	Kontrolle	-83	800	-85	-103	-	0,25
	(1) Adrenalin $5,5x10^{-6}$M			-85	- 85	18,0	0,25
	Atenolol 38 $x10^{-6}$M + (1) Adreanlin $5,5x10^{-6}$M			-85	- 97	-12,0	0,25
58-1	Kontrolle	-72	500	-70	-87,5	-	0,25
	(1) Adrenalin $5,5x10^{-6}$M			-70	-60	27,5	0,2
58-2	Kontrolle	-81	400	-80	-78,5	-	0,25
	(1) Adrenalin $5,5x10^{-6}$M			-80	-60	18,5	0,166
	Procain 730 $x10^{-6}$M + (1) Adrenalin $5,5x10^{-6}$M			-80	-60	-	0,166
	Atenolol 38 $x10^{-6}$M + Procain 730 $x10^{-6}$M + (1) Adrenalin $5,5x10^{-6}$M	-70	400	-80	-72	-12,0	0,25

Forts. Tabelle 1

Exp.-Nr.	Bedingungen	RP(mV)	APD(ms)	HP(mV)	V_h(mV)	s_∞ (mV)	Verschiebung von $\frac{1}{k}$
108-1	Kontrolle	-75	250	-75	-56,5	-	0,2
	(1) Adrenaline $5,5 \times 10^{-6}$M			-75	-40,5	16,0	0,5
	(d) Penbutolol 35 $\times 10^{-6}$M +(1) Adrenaline $5,5 \times 10^{-6}$M			-75	-46,0	- 5,5	0,33
	(1) Penbutolol $1,7 \times 10^{-6}$M (1) Penbutolol $3,5 \times 10^{-6}$M +(1) Adrenaline $5,5 \times 10^{-6}$M			-75	-46	- 5,5	0,33
	(1) Penbutolol 17 $\times 10^{-6}$M +(1) Adrenaline $5,5 \times 10^{-6}$M	-58	200	-75	-49,5	- 9,0	0,2
128-3	Kontrolle	-30	-	-70	-71	-	0,166
	(1) Penbutolol 17 $\times 10^{-6}$M			-70	-71	-	0,166
	(1) Penbutolol 17 $\times 10^{-6}$M +(1) Adrenaline $5,5 \times 10^{-6}$M	-58		-70	-71	-	0,166
146-2	Kontrolle	-70	500	-70	-67,5	-	0,125
	(1) Penbutolol 17 $\times 10^{-6}$M			-70	-67,5	-	0,125
	(1) Penbutolol 17 $\times 10^{-6}$M +(1) Adrenaline $5,5 \times 10^{-6}$M	-50		-70	-67,5	-	0,125

Legende zu Tabelle 1

RP - Ruhepotential in mV

HP - Haltepotential in mV

V_H - Halbaktivierungspotential in mV ($s_\infty = 0,5$)

s_∞ - Aktivierungsgrad

$\frac{1}{k}$ - reziproker Wert der Steilheit von s_∞

Inwieweit die Änderung der Steilheit überhaupt zu interpretieren ist, wie dies Tsien (1974a, b) ausführlich tat, ob hier tatsächlich ein eindeutiger pharmakologischer Effekt vorliegt, kann in dieser Arbeit auf Grund der sich widersprechenden Ergebnisse nicht beantwortet werden. Auch Tsien sieht heute (persönliche Mitteilungen) mehr Schwierigkeiten in der Interpretation der mittlerweile vorliegenden Ergebnisse als er das in seinen Arbeiten 1974 beschrieb. Sicher liegt ein energieabhängiger Prozeß vor, der von der Glucosezufuhr, der Sauerstoffversorgung der Faser und ähnlichen Parametern bestimmt wird. Obwohl diese Parameter stets konstant gehalten wurden, könnte die unterschiedliche Stärke der die Faser umgebenden Bindegewebsschicht einen entscheidenden Einfluß besitzen. Wichtig ist aber die eindeutige Aussage aller Autoren, daß die Kurve durch eine Adrenalingabe um ca. 2o mV in die depolarisierende Richtung verschoben wird, eine zusätzliche Gabe betablockierender Substanzen diese Verschiebung rückgängig macht.

Änderung der Zeitkonstanten

Abbildung 23 zeigt zwei Aufnahmen eines "envelope test" - wie er vorhin beschrieben worden ist. Es wurden vom Haltepotential (-8o mV) aus depolarisierende Pulse mit einer Amplitude von +4o mV und +3o mV appliziert. Die nach kürzerer Pulsdauer abnehmenden Amplituden der Ströme bei der Rückkehr zum Haltepotential ließen unter Adrenalin eindeutig eine Beschleunigung erkennen, die erst durch die zusätzliche Gabe von Atenolol aufgehoben wurde.

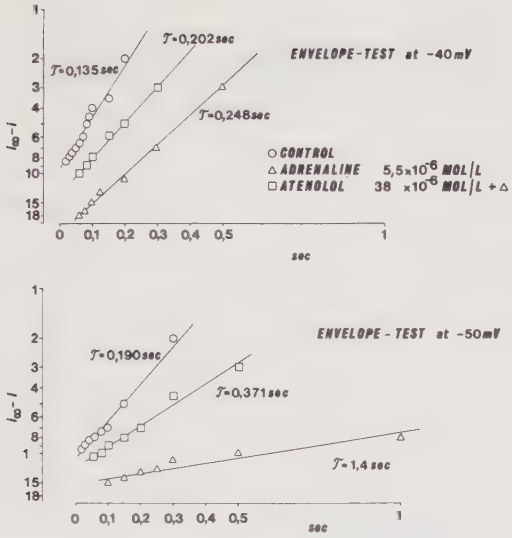


Abb. 23

Dieser Effekt von Adrenalin und Atenolol kam auch in der Darstellung der Geschwindigkeitskurve (Abbildung 24) über den gesamten Potentialbereich des Schrittmacherstromes zum Ausdruck, in die die Ergebnisse der "envelope tests" bei -4o mV und -5o mV eingegangen sind.

Unter dem Einfluß von Adrenalin wurden negativ zum Haltepotential keine zeitabhängigen Ströme mehr beobachtet(siehe auch Abbildungen 21 und 22: bei der Verschiebung der s_∞-Kurve wird s negativ zum Haltepotential gleich Null). Daher konnten für die Geschwindigkeitskurve unter Adrenalin in diesem Bereich auch keine Angaben gemacht werden. In anderen Experimenten wurde jedoch - und dies bestätigt die Darstellung in Abbildung 24 - ein Anwachsen von τ^{-1} in Bereichen negativ zum Haltepotential nachgewiesen. Gleiche Ergebnisse zeigten auch Hauswirth, Noble und Tsien (1968), Tsien (1974a, Abb. 4) sowie Hashimoto, Hauswirth und Ziskoven (1975, 1977).

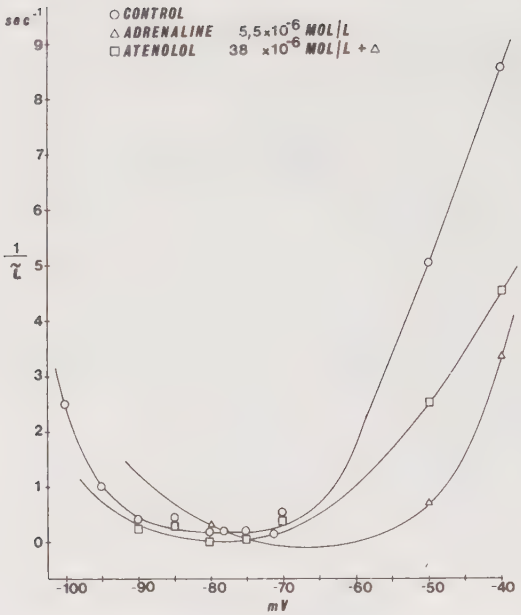


Abb. 24

Die Verschiebung der Geschwindigkeitskonstanten der physikochemischen Reaktionen des "gating" Mechanismus

Wie bereits im theoretischen Teil beschrieben, stellen nach der Hodgkin-Huxley-Theorie α und β in der Gleichung (16)

$$s_{\infty} = \frac{\alpha}{\alpha + \beta}$$

die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion des gating Mechanismus dar. (Abbildungen 25 und 26)

○ CONTROL
△ ADRENALINE 5,5x10⁻⁶ MOL/L
□ ATENOLOL 38 x10⁻⁶ MOL/L + △
1,5
1,0
0,5
0
α_s
sec⁻¹
90
80
70
60
50
40
mV

Abb. 25

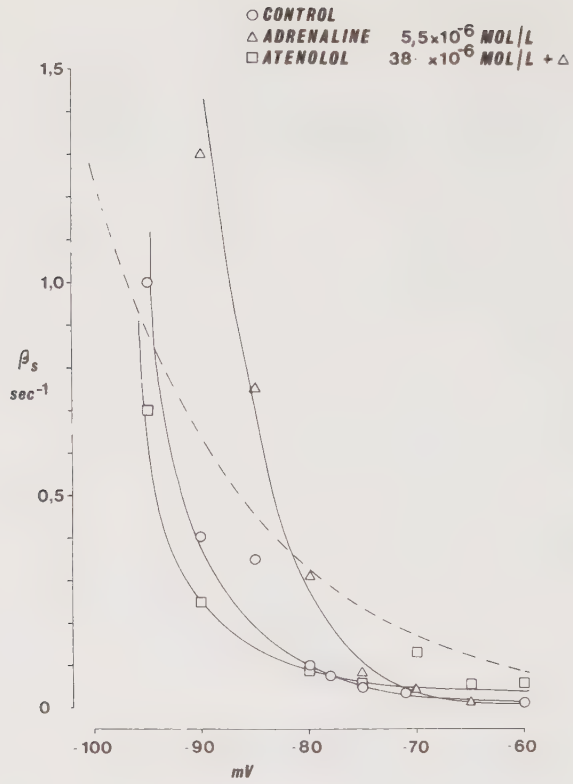


Abb. 26

Bei einem vorgegebenen Potential gilt Gleichung (14):

$$[1 - s] \underset{\beta}{\overset{\alpha}{\rightleftharpoons}} [s]$$

Die Geschwindigkeitskonstante der gesamten Reaktion ist demnach durch

$$K = \frac{\alpha}{\beta} = \frac{s_\infty}{1 - s_\infty}$$ in Gleichung (19) ausgedrückt.

(Eine wesentlich ausführlichere Diskussion der thermodynamischen Verhältnisse an der Membran - berechnet für einen und auch mehrere aktivierte Übergangszustände im Sinne der Eyring-Theorie - geben Noble und Tsien, 1969. Diese theoretischen Ansätze wurden mit den hier vorliegenden Ergebnissen im praktischen Experiment bestätigt. Es führte zu weit, die gesamte Theorie von Noble und Tsien in dieser Arbeit wiederzugeben.)

Wie der gating Mechanismus in der Membran durch die verschiedenen vorhin geschilderten Experimente beeinflußt wurde, zeigt Abbildung 27, wo ln K gegen das Membranpotential aufgetragen wurde. Die gestrichelten Linien geben die theoretischen Daten von Noble und Tsien für Kontrollbedingungen wieder, die Kurven nach Gabe von Adrenalin und Atenolol werden durch die in Abbildung 27 angegebenen Gleichungen beschrieben. (Abbildungen 25 und 26)

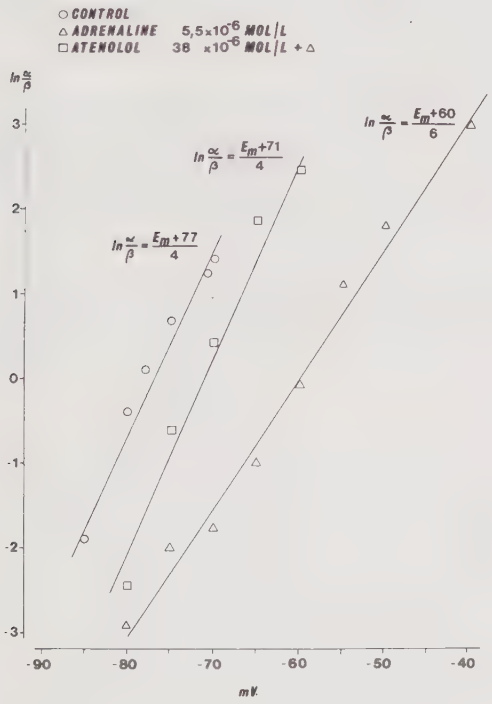


Abb. 27

Unter Adrenalin wird die Geschwindigkeitskonstante der Gesamtreaktion nicht nur in ihrer Spannungsabhängigkeit geändert sondern auch um einen Faktor o,66 verkleinert. Diese Veränderungen hebt der Zusatz von Atenolol nahezu vollständig wieder auf. Die Wirkung von Adrenalin kann also durch eine Beeinflussung des gating Mechanismus erklärt werden. Die Besetzung eines Betarezeptors beeinträchtigt demnach die Geschwindigkeit dieser Reaktion, die letztendlich für die Verschiebung von Kaliumionen durch die Membran verantwortlich ist. Betablockierende Substanzen schützen den Rezeptor und damit indirekt auch den gating Mechanismus und den Transport der Ionen durch die Membran.

Keine Veränderung der vollaktivierten Strom-Spannungs-Beziehung

Wie die Abbildungen 28 und 29 zeigen, ergab sich in der vollaktivierten Strom-Spannungs-Beziehung während des gesamten Experimentes keine Veränderung. Weder Adrenalin noch Prokain oder Atenolol konnten $\overline{i_{K2}}$ beeinflussen.

Da die vollaktivierte Strom-Spannungs-Beziehung eine Größe ist, die zu der Anzahl der zur Verfügung stehenden Kaliumkanäle in der Membran proportional ist, muß aus diesem Ergebnis gefolgert werden, daß sich die Anzahl der Kaliumkanäle nicht geändert hat.

Besonders interessant war bei diesen Experimenten, daß keine Änderung in den Gleichrichtereigenschaften der Membran erfolgte.

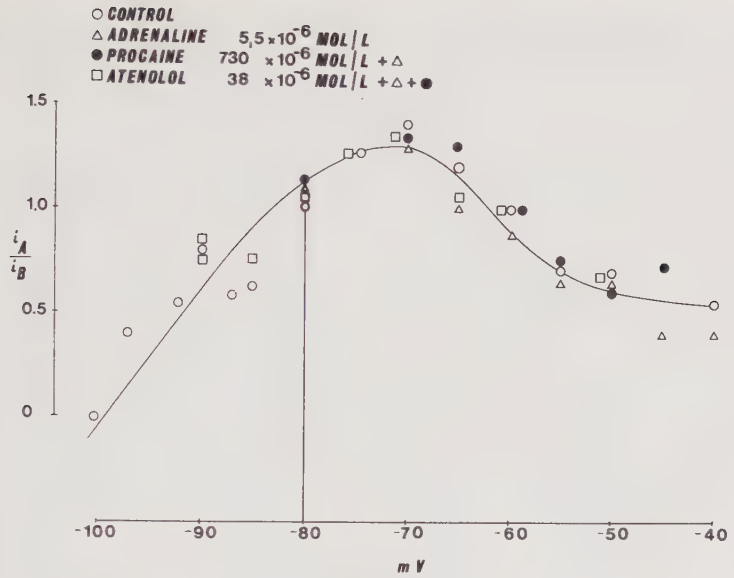

○ CONTROL
△ ADRENALINE 5,5×10⁻⁶ MOL/L
● PROCAINE 730 ×10⁻⁶ MOL/L +△
□ ATENOLOL 38 ×10⁻⁶ MOL/L +△+●
1.5
1.0
0.5
0
iA/iB
-100
-90
-80
-70
-60
-50
-40
mV

Abb. 28

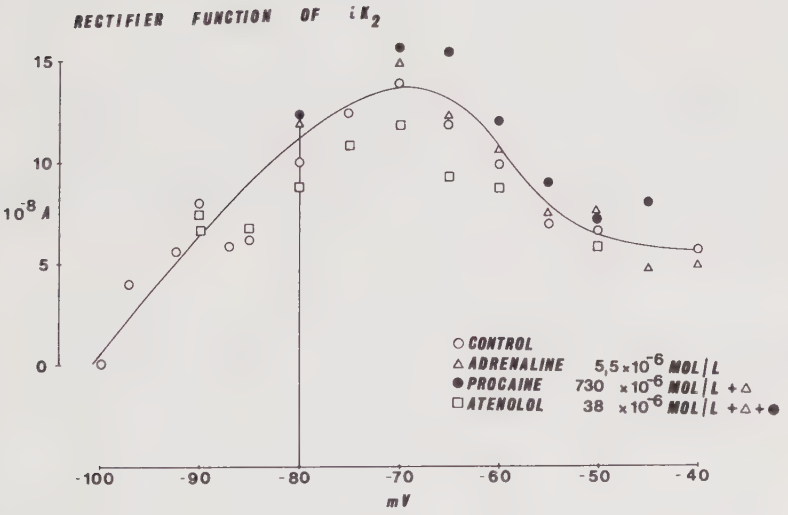

RECTIFIER FUNCTION OF iK2
15
10
5
0
10⁻⁸ A
-100
-90
-80
-70
-60
-50
-40
mV
○ CONTROL
△ ADRENALINE 5,5×10⁻⁶ MOL/L
● PROCAINE 730 ×10⁻⁶ MOL/L +△
□ ATENOLOL 38 ×10⁻⁶ MOL/L +△+●

Abb. 29

Lediglich nach Zugabe des Betablockers könnte aus den in Abbildung 29 wiedergegebenen Daten auf eine leichte Erniedrigung der absoluten Größe von $\overline{i_{K2}}$ geschlossen werden, was jedoch durch weitere gleichartige Experimente nicht bestätigt wurde.

Die absolute Größe der vollaktivierten Strom-Spannungs-Beziehung stellt die Amplituden der verschiedenen s_∞-Kurven bei verschiedenen Haltepotentialen dar (Noble und Tsien, 1968; Hauswirth, Wehner und Ziskoven, 1977).

Unter Adrenalin wurde sowohl eine leichte Verminderung dieser Amplitude (Hauswirth, Noble und Tsien, 1968) als auch keine Änderung (Tsien, 1974a, Abb. 8) oder aber sogar eine leichte Erhöhung (Tsien, 1974a, Abb. 6) festgestellt. Auch nach der Zugabe eines Betablockers wurde sowohl eine leichte Erhöhung (mit Pronethalol; Hauswirth, Noble und Tsien, 1968) als auch eine leichte Verminderung (mit Atenolol, Abbildung 29 und mit Penbutolol, Abbildung 35) vermerkt.

Da die Änderungen jeweils sehr geringfügig waren und zudem in unterschiedliche Richtungen tendierten, darf angenommen werden, daß es sich bei der leichten Änderung von $\overline{i_{K2}}$ nicht um einen systematischen Effekt handelt. Außerdem ist es nicht einfach zu unterscheiden, ob eine Änderung der absoluten Größe von $\overline{i_{K2}}$ eine direkte pharmakologische Membranwirkung der adrenergen Substanzen ist, oder ob solche Änderungen auf die Verschiebung des Gleichgewichtspotentials für den Schrittmacherstrom beruhen (Cohen, Daut und Noble, 1976). Auch zeigten Weld und Bigger (1976), daß die Amplitude von s_∞ unter einem anderen Lokalanästhetikum, Lidokain, in geringerer Konzentration nicht merklich geändert wurde, bei hoher Konzentration dagegen eine Verminderung zu beobachten war.

Ein klarer Einfluß adrenerger Substanzen (Adrenalin und Betablocker) auf die Anzahl der Kaliumkanäle in der Membran konnte demnach nicht nachgewiesen werden. Ihre Wirkung auf den Schrittmacherstrom erstreckt sich lediglich auf dessen Kinetik.

Effekt des Betablockers Penbutolol (1-Isomer) auf den Schrittmacherstrom ohne vorherige Applikation von Adrenalin

Betablockierende Substanzen kompensieren die mit Hilfe betastimulierender Substanzen hervorgerufene Verschiebung der s-Kinetik des Schrittmacherstromes durch Rückverschiebung derselben. Diese Wirkung könnte einmal darauf beruhen, daß Betablocker ebenso wie Adrenalin einen Betarezeptor angreifen, jedoch für eine Verschiebung in hyperpolarisierender Richtung sorgen. Da es sich bei der Kinetik des gating Mechanismus um eine physiko-chemische Reaktion handelt, erscheint ein solcher Gedanke als durchaus möglich. Zum anderen könnte ein Betablocker lediglich eine reine Schutzwirkung für den Rezeptor besitzen, so daß ein Angriff von Adrenalin unmöglich würde. Betablocker sollten dann keine Eigenwirkung auf den Rezeptor besitzen, und es sollte unmöglich sein, nach Applikation von Adrenalin die Kinetik des Schrittmacherstromes über ihre normale Position unter Kontrollbedingungen hinaus in die hyperpolarisierende Richtung zu verschieben. Betablocker wirkten dann als kompetitive Hemmer, die keinerlei Eigenwirkung auf die Membran haben, obwohl die Rezeptor-Blocker-Bindung fester sein sollte als die Rezeptor-Stimulator-Bindung.

Abbildung 3o zeigt Ausschnitte aus Originalaufzeichnungen eines Experimentes, in welchem einer Faser unter Kontrollbedingungen nach Zugabe des Betablockers Penbutolol (1-Isomer) und nach zusätzlicher Adrenalingabe depolarisierende Pulse von +4o mV (bei einem Haltepotential von -8o mV) appliziert wurden.

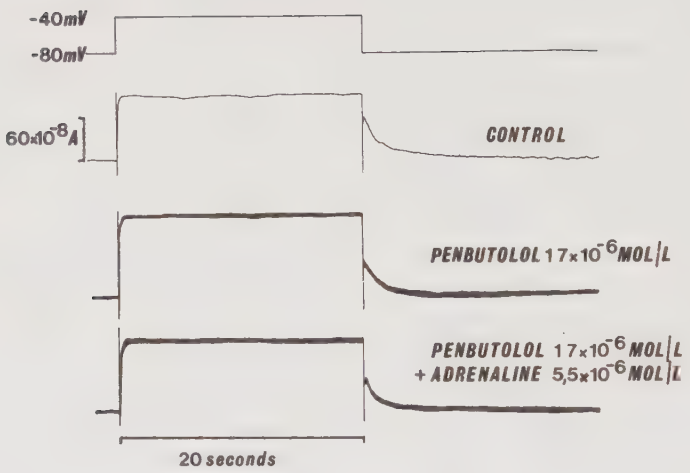


Abb. 30

Ein Effekt auf die Membranströme des Schrittmachersystems konnte nicht nachgewiesen werden, wie auch die Darstellung von s_∞ unter den gleichen Bedingungen zeigt. Lediglich nach Zugabe des Betablockers wurde einige Male eine leichte Verringerung der Amplitude von s_∞ sichtbar, die sich jedoch nicht als systematisch erwies. Der zeitliche Verlauf der Ströme war unverändert.

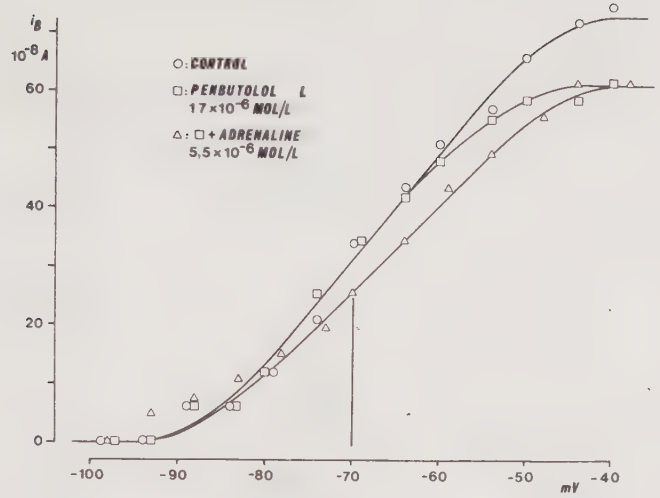

i_B
10^{-6} A
60
40
20
0
○: CONTROL
□: PENBUTOLOL L
1.7×10^{-6} MOL/L
△: □ + ADRENALINE
$5,5 \times 10^{-6}$ MOL/L
-100
-90
-80
-70
-60
-50
-40
mV

Abb. 31

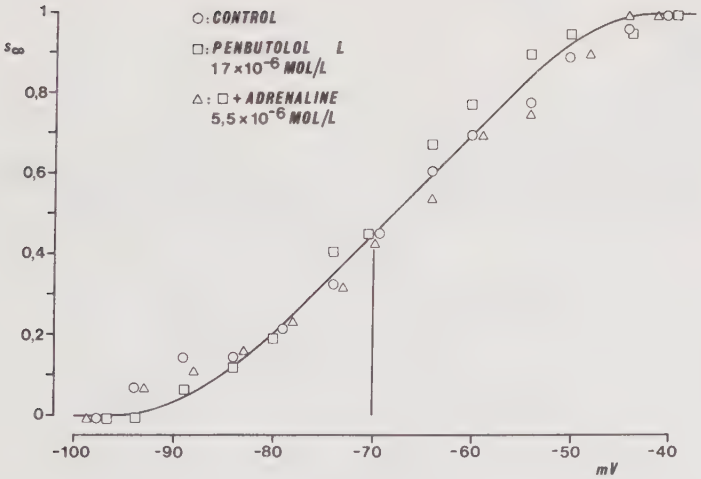

s_∞
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
○: CONTROL
□: PENBUTOLOL L
1.7×10^{-6} MOL/L
△: □ + ADRENALINE
$5,5 \times 10^{-6}$ MOL/L
-100
-90
-80
-70
-60
-50
-40
mV

Abb. 32

Hervorzuheben ist, daß keine Verschiebung der Kurve durch Adrenalin zu sehen war, da die Rezeptoren durch Penbutolol offensichtlich geschützt (gleich blockiert) waren.

Die Aufnahme der bereits beschriebenen "envelope tests" (Abbildung 33) wie auch die gesamte Geschwindigkeitskurve (Abbildung 34) zeigten keinerlei Veränderungen.

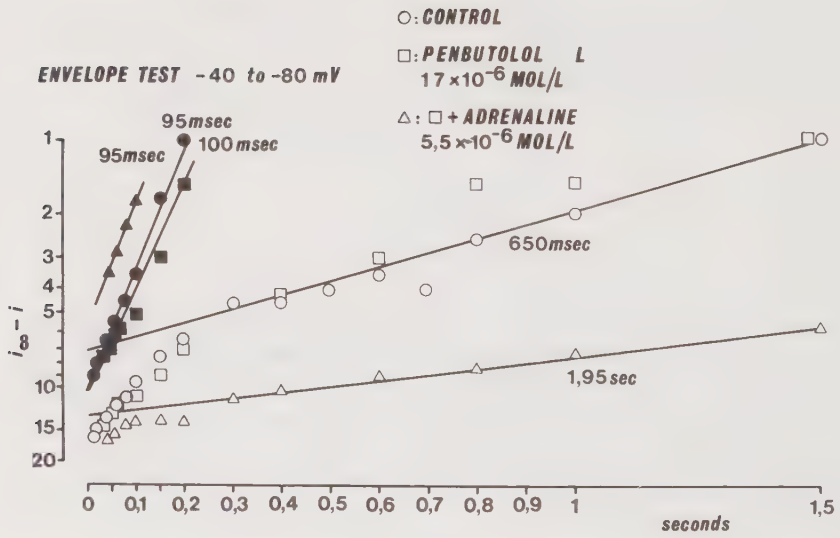


Abb. 33

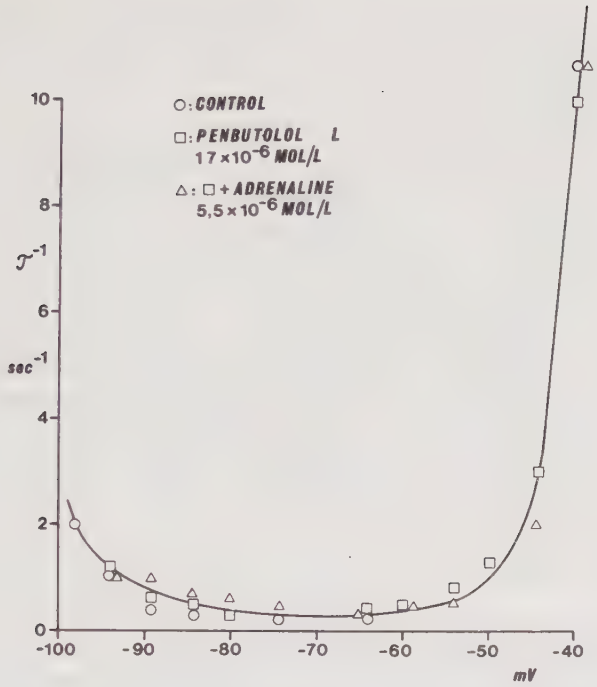


Abb. 34

Aus dem "envelope test" ist jedoch ersichtlich, daß bei den hier verwendeten Klemmpulsen zwei Stromsysteme aktiviert wurden. Die halblogarithmische Darstellung der Ströme bei der Rückkehr zum Haltepotential ergab keine Gerade, die Stromaufzeichnungen resultierten demnach aus zwei verschiedenen Stromsystemen mit unterschiedlichen Zeitkonstanten. Die Trennung dieser Stromsysteme erfolgte nach Noble und Tsien durch graphische Subtraktion - wie dies auch in der physikalischen Chemie bei der Darstellung gleichzeitig ablaufender Reaktionen mit unterschiedlichen Zeitkonstanten üblich ist. Das schnellere System, dessen Zeitkonstante unverändert blieb, ist das Schrittmachersystem, das in dieser Arbeit untersucht werden soll. Das langsamere System

stellt das von Noble und Tsien (1969a, b) und Hauswirth, Noble und Tsien (1972a, b) beschriebene i_{X1}-System dar, das eine wesentlich langsamere Zeitkonstante in diesem Potentialbereich besitzt (siehe auch Diskussion).

Der Betablocker Penbutolol war nicht in der Lage, die Zeitkonstante des i_{X1}-Systems zu verändern, eine zusätzliche Adrenalingabe verlangsamte es jedoch erheblich. Dies läßt darauf schließen, daß das i_{X1}-System nicht über Betarezeptoren gesteuert wird, also auch nicht durch Betablocker vor dem Angriff von Adrenalin geschützt werden kann. Eine genauere Untersuchung der Wirkung von Adrenalin auf dieses Stromsystem sollte hier leicht Aufschluß geben können. Die Ergebnisse bezüglich i_{X1} stimmen im übrigen auch mit den Erfahrungen von Kass und Tsien (1976) überein, die eine Verschiebung der Kinetik von i_{X1} durch Adrenalin in die hyperpolarisierende Richtung für die Verkürzung des Aktionspotentials durch adrenerge Drogen (Noble und Tsien, 1969a) verantwortlich machten.

Die vollaktivierte Strom-Spannungs-Beziehung

Die vollaktivierte Strom-Spannungs-Beziehung, $\overline{i_{K2}}$, (Abbildung 35) zeigte ebenso wie erwartet keinerlei wesentliche Veränderung bei den oben beschriebenen Versuchsbedingungen. Vielleicht ist eine leichte Verminderung ihrer absoluten Größe nach Gabe von Penbutolol zu erwähnen, die aber in weiteren Experimenten nicht systematisch auftrat.

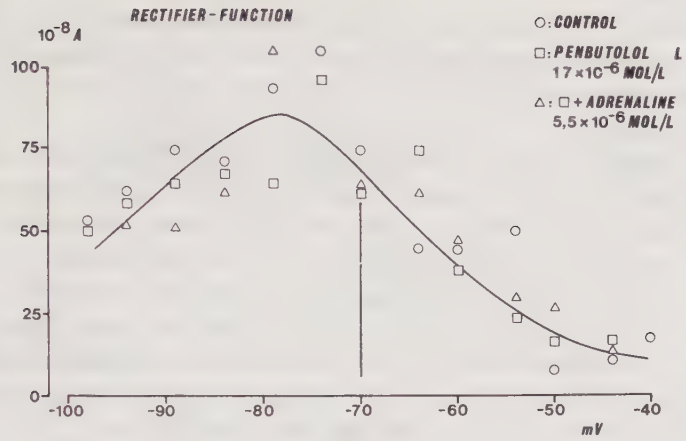


Abb. 35

Da die Kinetik nicht verändert wurde, muß diese geringfügige Verminderung mit der in Abbildung 31 beschriebenen Verringerung der s_∞-Amplitude korreliert werden.

Auch diese Ergebnisse stützen die Annahme, daß die Kinetik des Schrittmacherstromes über Betarezeptoren gesteuert wird.

Stereoselektivität der Betarezeptoren

Betarezeptorenblocker sind in der Lage, Betarezeptoren vor dem Angriff von Adrenalin zu schützen und somit eine Wirkung auf den Schrittmacherstrom zu unterbinden. Außerdem können sie die Wirkung von Adrenalin auf der Membran aufheben, das heißt, sie können Adrenalin aus seiner Bindung an den Rezeptor verdrängen. Wie diese Bindung aussieht, ist nicht bekannt, da keinerlei bewiesene oder auch nur einigermaßen glaubhafte Vorstellungen über die Struktur des Betarezeptors selbst existieren.

Es wurde nunmehr der Versuch unternommen, in eindeutigen voltage clamp Experimenten die Frage zu klären, ob das l-Isomer eines Blockers mehr Wirkung besitzt als sein d-Isomer. Dies ist für Adrenalin der Fall.

Dazu wurde eine Purkinje Faser einer genauen voltage clamp Analyse unter Kontrollbedingungen unterzogen und danach dem Einfluß von Adrenalin ausgesetzt. Nunmehr wurde zuerst zusätzlich eine große Konzentration ($35 \cdot 10^{-6}$ Mol/l) des d-Isomeren von Penbutolol zugegeben.

Abbildung 36 zeigt an Ausschnitten aus Originalaufnahmen ebenso wie Abbildung 37 an der gesamten s_∞-Kurve, daß dadurch die Verschiebung der Aktivierungskurve durch Adrenalin teilweise - zu ca. einem Drittel - rückgängig gemacht werden konnte.

Zwei kleinere Konzentrationen des l-Isomeren des Blockers ($1{,}7 \cdot 10^{-6}$ Mol/l und $3{,}5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l) hatten ähnliche Effekte. Erst eine Konzentration von $17 \cdot 10^{-6}$ Mol/l des l-Isomeren konnte eine wesentliche weitere Rückverschiebung von s_∞ und somit die weitgehende Aufhebung der Adrenalinwirkung bringen.

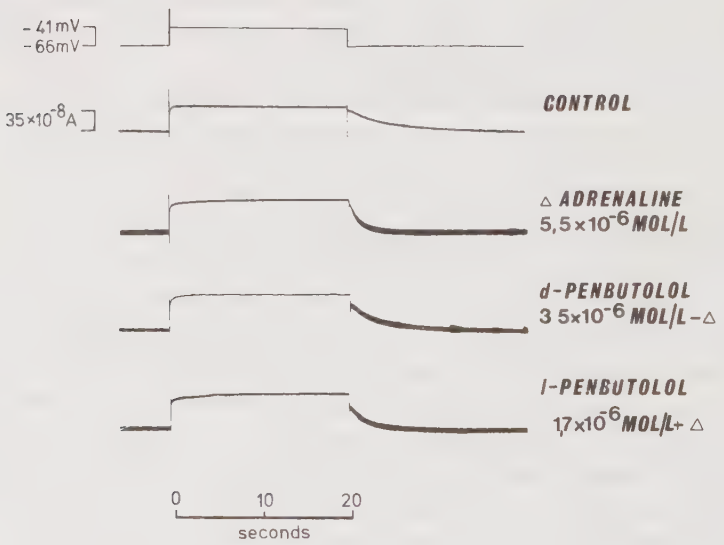


Abb. 36

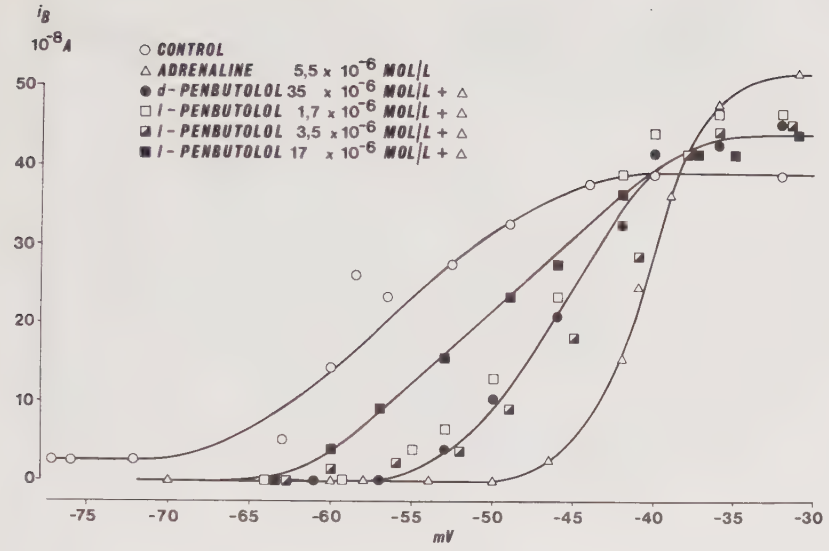


Abb. 37

Durch die Normierung der Aktivierungskurve, wie sie in Abbildung 38 dargestellt ist, wird der Grad der Rückverschiebung deutlich ablesbar. Das d-Isomer von Penbutolol bewirkt ebenso wie eine 1o- bis 2ofach kleinere Dosis l-Isomer eine Aufhebung des Adrenalineffektes um ca. ein Drittel. Um eine Rückverschiebung um ca. zwei Drittel zu gewährleisten, muß jedoch auch die Konzentration des l-Isomeren um das Zehnfache gesteigert werden.

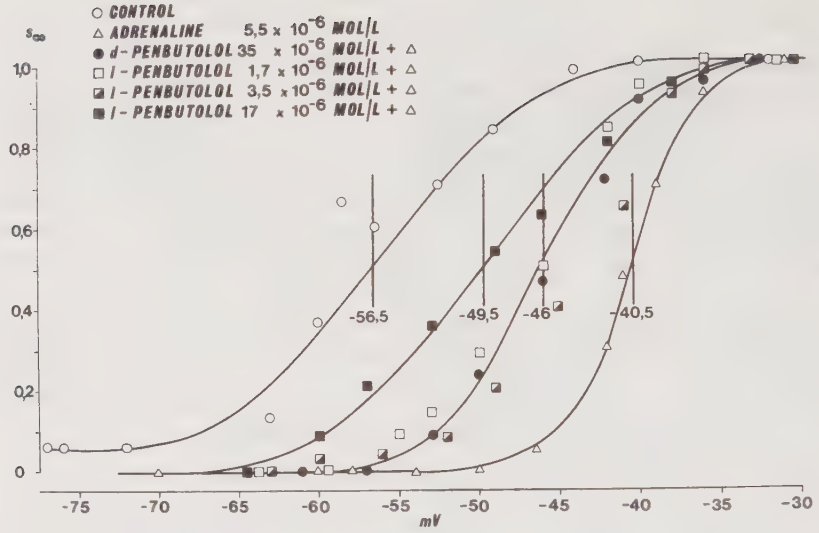


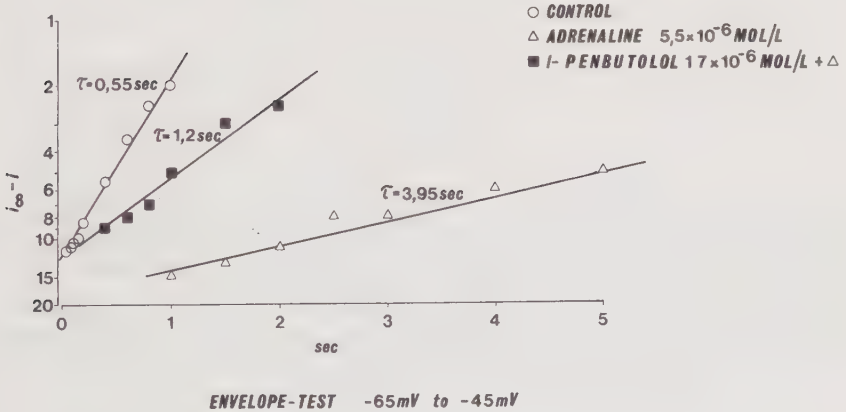
Abb. 38

Gleichwohl verdeutlicht Abbildung 37,daß die größere Wirksamkeit des l-Isomeren auch mit einer etwas stärkeren Verminderung der Amplitude von s_∞ verbunden ist. Die immer noch doppelt so große Konzentration des d-Isomeren zeigt in dieser Hinsicht keine Wirkung. Doch muß gerade bei der Interpretation dieses Effektes berücksichtigt werden, daß hier zum ersten Mal an einer Faser eine vollständige voltage clamp Analyse unter Kontrollbedingungen und insgesamt fünf verschiedenen pharmakologischen Bedingungen durchgeführt wurde. Die Messungen als solche benötigten wenigstens jeweils 3o Minuten - außerdem wurden nach jedem Durchgang Auswaschzeiten von mindestens 2o Minuten nach dem Umschalten auf eine neue Lösung eingehalten. Dadurch erstreckte sich das gesamte Experiment auf ca. fünf Stunden.

Ein solches Experiment an ein und derselben Faser mit den gleichen Mikroelektroden zu erhalten, ohne daß die Faser

nachgewiesenermaßen Schaden nimmt, darf sicherlich als Ausnahme angesehen werden. Andererseits ist dies die einzig exakte Methode, alle Versuchsbedingungen konstant zu halten. - Inwieweit die Verminderung der Amplitude der Aktivierungskurve im letzten Durchlauf auch auf die lange Versuchszeit zurückzuführen war, ist nicht eindeutig zu klären, eine Interpretation sollte hier vorsichtig sein.

Die Abbildungen 39 und 40 geben die Ergebnisse des "envelope tests" und der U-förmigen Geschwindigkeitskurve wieder, die genau den Erwartungen entsprachen: Adrenalin verlangsamte die Zeitkonstante der Kinetik des Schrittmacherstromes bei einem Klemmpotential von -45 mV erheblich, l-Penbutolol dagegen hob diese Wirkung **weitgehend auf**; die Geschwindigkeitskurve wurde wie erwartet verschoben.



ENVELOPE-TEST -65mV to -45mV

Abb. 39

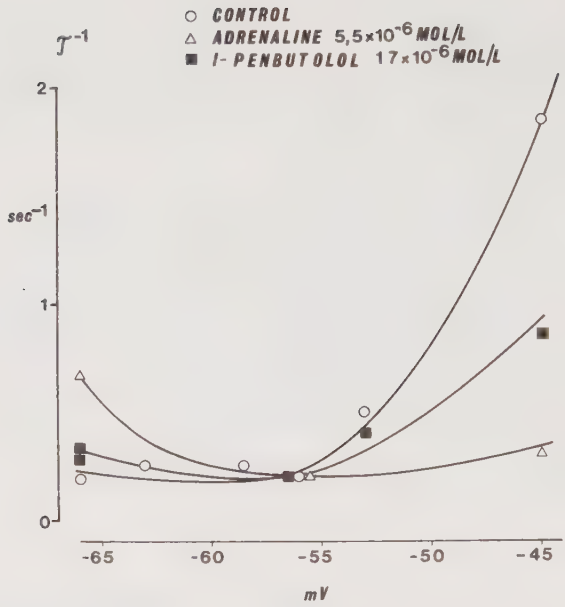


Abb. 4o

Wie auch bei allen anderen vorherigen Ergebnissen beobachtet wurde, erstreckten sich betastimulierende und -blockierende Wirkung der angewendeten Pharmaka lediglich auf die Kinetik des Systems, während die Anzahl der Kaliumkanäle in der Membran unbeeinflußt blieb, wie Abbildung 41 an Hand der vollaktivierten Strom-Spannungs-Beziehung verdeutlicht.

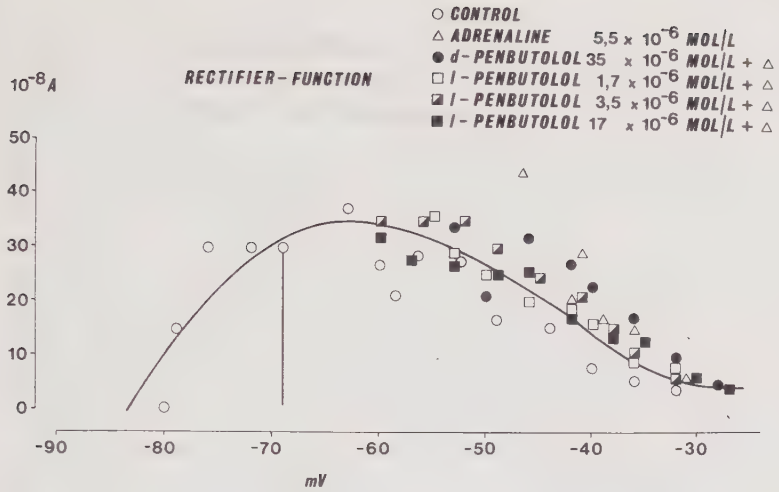

○ CONTROL
△ ADRENALINE 5,5 x 10⁻⁶ MOL/L
● d-PENBUTOLOL 35 x 10⁻⁶ MOL/L + △
□ l-PENBUTOLOL 1,7 x 10⁻⁶ MOL/L + △
◪ l-PENBUTOLOL 3,5 x 10⁻⁶ MOL/L + △
■ l-PENBUTOLOL 17 x 10⁻⁶ MOL/L + △
10⁻⁸A
RECTIFIER-FUNCTION
50
40
30
20
10
0
-90
-80
-70
-60
-50
-40
-30
mV

Abb. 41

DISKUSSION

Nach den vorliegenden Ergebnissen können nunmehr die eingangs aufgestellten Fragen beantwortet werden.

Daß alphastimulierende Pharmaka keinen positiv chronotropen Effekt auf den Herzmuskel haben, kann nicht mehr überraschen - obwohl Alpharezeptoren vorhanden sind (Cranefield, Hoffman und Wit, 1971; Giotti, Ledda und **Mannaioni**, 1968, 1973), da der Schrittmacherstrom nicht über Alpharezeptoren gesteuert wird. Daß solche Substanzen jedoch einen Einfluß auf das i_{K1} -System besitzen, kann aus den vorliegenden Daten nicht eindeutig geschlossen werden, obwohl in Abbildung 14 eine Veränderung des sofort verfügbaren Spannungssprunges $\Delta i_{inst.B}$ beim Zurückklemmen zum Haltepotential zu beobachten war. Wie im theoretischen Teil ausführlich dargestellt, könnten hier ebensogut nur zeitunabhängige "instantaneous"-Anteile anderer Stromsysteme betroffen sein. Der Schrittmacherstrom ist sicherlich nicht abhängig von Alpharezeptoren.

Auch Lokalanästhetika haben keinen Einfluß auf den i_{K2} - Strom, was mit den Ergebnissen von Weld und Bigger (1976) übereinstimmt, die nach Applikation von Lidokain ebenfalls keine Verschiebung der Aktivierungskurve s_∞ fanden. Erst bei sehr hohen Konzentrationen (5 mg/l) beobachteten sie eine Verkleinerung der Amplitude der Aktivierungskurve, was jedoch in solch hohen Konzentrationen sicher nicht mehr als spezifisch anzusehen ist. Bei ähnlich hohen Konzentrationen eines Lokalanästhetikums wurden in den hier präsentierten Experimenten solche Veränderungen nicht deutlich (siehe Abbildung 21).

Die Befunde bezüglich der Wirkung von Lokalanästhetika sind insofern von Bedeutung, da sehr viele Betablocker über ausgesprochen starke lokalanästhetische Nebeneffekte verfügen (Morales-Arguilera und Vaughan-Williams, 1969). Gleichzeitig konnte aber auch nachgewiesen werden, daß Betarezeptorenblocker ohne einen solchen Nebeneffekt ebenso auf Betarezeptoren wirken wie die ersteren.

Werden betablockierende Substanzen allein auf den Herzmuskel gegeben, haben sie keine Wirkung auf den Schrittmacherstrom.

Dieses Resultat interessiert klinisch, da die Gabe von solchen Substanzen als Antiarrhythmika - im Experiment als Schutz vor der Adrenalinwirkung - ohne Störung des Schrittmacherstromes möglich ist. Es sei hier erwähnt, daß Betablocker in der Klinik ein sehr breites Anwendungsspektrum besitzen; in Frage kommen vor allem die kurative und prophylaktische Therapie bei Herzarrhythmien sowie Streßschäden und sogar Hypertonie. Über die bisher vorliegende Literatur dieses Gebietes hier auch nur einen Abriß zu geben, ist sicherlich wegen der Vielzahl unmöglich. Betablocker müssen eine Bindung mit dem Betarezeptor eingehen, die stärker ist als die Bindung des Adrenalins an den Rezeptor, da sie Adrenalin aus seiner Bindung verdrängen oder eine solche von vornherein verhindern können. Diese Bindung wird von anderer Natur als die der stimulierenden Substanzen sein, da sie selbst keine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit des gating Mechanismus in die umgekehrte Richtung über die normale Ausgangssituation hinaus verursachen. Ein Eingriff in den kinetischen Mechanismus der Kaliumkanäle für den Schrittmacherstrom via Rezeptor erfolgt nicht durch Betablocker allein. Es handelt sich somit bei der Steuerung der gating Partikel der Kaliumkanäle durch den Rezeptor um einen Mechanismus, der nur in einer Richtung stimuliert und wieder geblockt werden kann. Die zugrunde liegende Reaktion am Kanal selbst - der eigentliche gating Mechanismus - hat demnach unter Normalbedingungen eine Basisgeschwindigkeit, die über die Steuerung durch seine Rezeptoren nicht unterschritten werden kann. Welcher Art diese Steuerung ist, welche Beziehung zwischen Rezeptor und Kanal besteht, kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht geklärt werden - vielleicht bedarf es dazu erst der ausführlichen chemischen Analyse der Betarezeptoren und der gating Partikel, um diese Verhältnisse verstehen zu können.

Eine Hypothese stellte auch in dieser Frage wieder Tsien (1974a) auf, der einen Zusammenhang zwischen der Applikation von Adrenalin, der Beeinträchtigung der Schrittmacherkinetik und der Aktivierung des Adenylcyclase-ATP-Systems an der Innenseite einer Membran forderte, wo Adenylcyclase die Reaktion $ATP \longrightarrow cAMP + 2PO_4^{3-}$ katalysiert. Eine quantitative Untersuchung

dieser Phänomene präsentierten Zimmer und Gerlach (1974) und Zimmer (1976) in rein biochemischer Hinsicht. Doch liegt bisher ebensowenig eine schlüssige Erklärung der Zusammenhänge vor wie in den Ausführungen von Hauswirth, Noble und Tsien (1968), die eine Fixierung von positiven Ladungen an der Außenseite der Membran durch Adrenalin annahmen. Tsien (1974) zeigte aber inzwischen, daß diese Überlegung wahrscheinlich nicht zutrifft, er nahm eine Fixierung von negativen Ladungen an der Innenseite der Membran durch Phosphationen an, die bei der Spaltung von ATP - wie oben beschrieben - entstehen. All diese Annahmen laufen darauf hinaus, daß die Membran hyperpolarisiert werden soll, und durch eine solche Veränderung des elektrischen Feldes an der Membran die Kaliumkanäle und ihre Kinetik beeinflußt werden.

Daß eine Änderung des äußeren Ionenmilieus z.B. eine höhere Konzentration von Calciumionen oder die Applikation von La^{3+}-Ionen (Tsien, 1974) tatsächlich in ähnlicher Weise wie Adrenalin - wenn auch weniger ausgeprägt - Einfluß auf die Kinetik des Schrittmacherstromes nimmt, bringt allenfalls mehr Ungewißheit denn eine Lösung der Problematik.

Immerhin ist trotz allem zu vermerken, daß es sich bei Betarezeptoren um Moleküle handeln muß, die mit Betablockern stereoselektive Reaktionen eingehen. Aus dieser bisher einzigen gesicherten chemischen Aussage über einen Betarezeptor gleich Spekulationen über den möglichen Aufbau eines solchen Rezeptors anzustellen, erscheint zu gewagt.

Wichtigstes Ergebnis aller Experimente und Untersuchungen ist jedoch die Feststellung, daß die ursprüngliche Hypothese von Tsien, der Schrittmacherstrom am Herzen sei von Betarezeptoren gesteuert und in seiner Kinetik kontrolliert, nunmehr endgültig gesichert und bewiesen ist. Alle anderen theoretischen Möglichkeiten wurden eindeutig ausgeschlossen.

Ein weiteres Ergebnis der vorliegenden Experimente ist auch die Analyse der vollaktivierten Strom-Spannungs-Beziehung. Diese wurde jeweils sowohl nach den Methoden von Noble und Tsien (1968) als auch nach dem im Anhang II vorgestellten Verfahren direkt aus den sofort verfügbaren "instantaneous" Stromsprüngen

berechnet. Die Funktion $\overline{i_{K2}}$ steht für die Anzahl der verfügbaren Kaliumkanäle in der Membran. Betablockierende und -stimulierende Substanzen sind im allgemeinen in den gebräuchlichen Konzentrationen nicht in der Lage, die Anzahl dieser Kanäle zu verändern, obwohl bei einigen Experimenten leichte Beeinträchtigungen zu vermerken waren (Verkleinerung der absoluten Größe der "rectifier function" nach längerer Dauer des Experimentes). Auch ändern diese Pharmaka weder die einwärts gerichtete Gleichrichtung noch die als "negative slope" in die Literatur eingegangene negative Steigung der vollaktivierten Strom-Spannungs-Beziehung im Bereich positiv zu -7o mV.

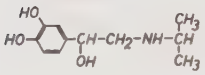
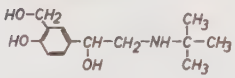
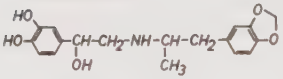
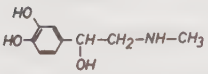
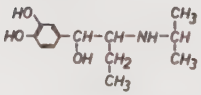
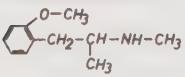
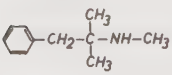
Die Steuerung des Schrittmacherstromes am Herzmuskel erfolgt also ausschließlich über die Kinetik des gating Mechanismus.

Ein Ergebnis, das mehr zufällig erhalten wurde, stellt Abbildung 33 dar, die die Aufnahme eines "envelope tests" bei -4o mV wiedergibt. Hier wurden eindeutig zwei Stromsysteme aktiviert, da die Funktion der abnehmenden Amplituden bei Zurückklemmen zum Haltepotential in halblogarithmischer Darstellung keine Gerade ergab, sondern eine Kurve, die durch graphische Subtraktion erst in zwei Geraden aufzuteilen war. Neben dem Schrittmacherstrom wurde also ein zweiter Strom aufgezeichnet, der an Hand seiner Zeitkonstanten (65o msec unter Kontrollbedingungen bei -4o mV) als der am Plateau des Aktionspotentials beteiligte Strom i_{X1} identifiziert wurde. Dieses Stromsystem wurde unter Betablockade sichtlich verlangsamt (Zeitkonstante 1,95 sec). Dieser Befund ist insofern von großem Interesse, da Adrenalin keine Änderung der Zeitkonstanten hervorrief, der Strom i_{X1} jedoch ebenso wie der Schrittmacherstrom von Kaliumionen getragen wird. Allein dieses unterschiedliche Verhalten zweier Ströme, die beide durch den Transport gleicher Ionen durch die Membran getragen werden, sollte Anlaß geben zu weiteren Untersuchungen.

ANHANG I

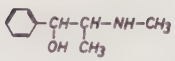
Aufstellung der heute gebräuchlichen Substanzen, die in der Lage sind, Alpha-, bzw. Betarezeptoren zu stimulieren oder zu blokkieren

α - und β- stimulierende Substanzen

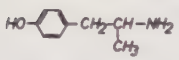
	Wirkung auf α- Rezeptoren	Wirkung auf β- Rezeptoren
ISOPRENLIN: 		↑↑↑
SALBUTAMOL: 		↑↑
PROTOKYLOL: 		↑↑
ADRENALIN: 	↑	↑↑
ISOETARIN: 	↑	↑
METHOXYPHENAMIN: 	↑	↑
MEPHENTAMIN: 	↑	↑

α- β-

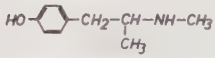
EPHEDRIN:



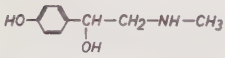
HYDROXYAMPHETAMIN:



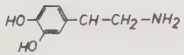
PHOLEDRIN:



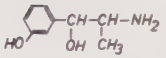
SYNEPHRIN:



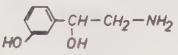
NORADRENALIN:



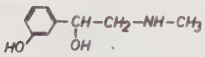
METARAMINOL:



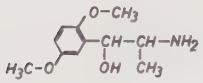
NORFENEPHRIN:



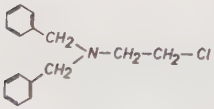
PHENYLEPHRIN:



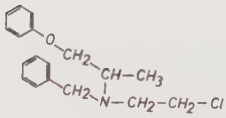
METHOXAMIN:



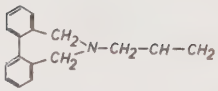
ALPHA BLOCKIERENDE SUBSTANZEN:



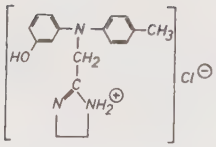
DIBENAMIN



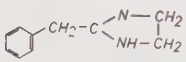
PHENOXYBENZAMIN



AZAPETIN

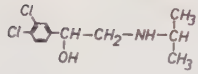


PHENTOLAMIN

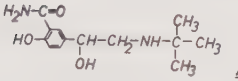


TOLAZOLIN

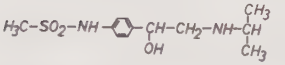
BETA-BLOCKIERENDE SUBSTANZEN



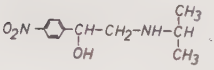
DICHLORISOPRENALIN



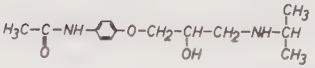
AH 3474



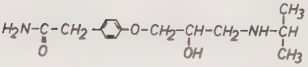
SOTALOL



INPEA

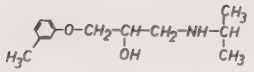


PRACTOLOL

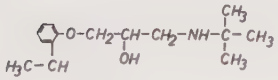


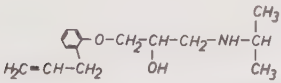
ICI 66082

(Atenolol)

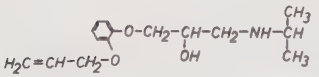


DOBEROL

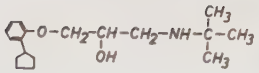




ALPRENOLOL

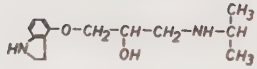


OXPRENOLOL

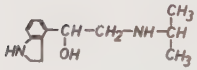


HOE 893

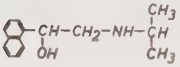
(Penbutolol)



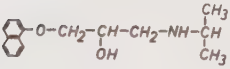
VISKEN



PINDOLOL

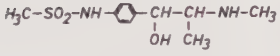


PRONETHALOL

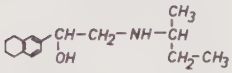


PROPRANOLOL

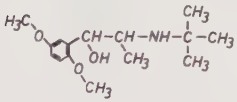
BETA-BLOCKIERENDE SUBSTANZEN
ANDERER STRUKTUR:



METALOL

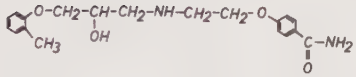


BUTRIDRIN



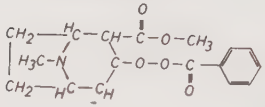
BUTOXAMIN

(nur β_1-wirksam)

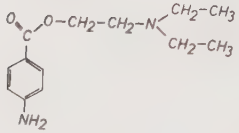


TOLAMOLOL

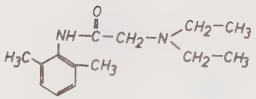
LOKALANAESTHETIKA



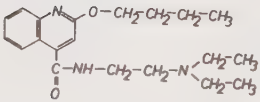
KOKAIN



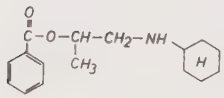
PROCAIN



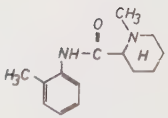
LIDOKAIN



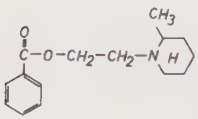
CHINCHOCAIN



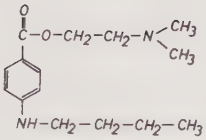
HEXYLCAIN



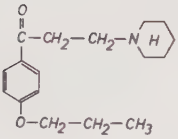
MEPIVACAIN



PIPEROCAIN



TETRACAIN



PROPOXYPIPEROCAIN

ANHANG II

Eine neue Methode $\overline{i_{K2}}$ zu berechnen

Durch eine leichte Umformung der Gleichung (11a) ist es möglich, $\overline{i_{K2}}$ für jedes Klemmpotential direkt aus den sogenannten "instantaneous" Stromsprünge zu berechnen. Wichtig ist jedoch, daß diese Berechnung die "rectifier ratio" zum Ergebnis hat, die noch mit Δi_{K2max} multipliziert werden muß, will man die vollaktivierte Strom-Spannungs-Beziehung erhalten, die "rectifier function". Δi_{K2max} stellt die gesamte Stromaplitude der **s-Aktivierungskurve** dar.

$$\Delta i_{inst.A} = \Delta i_{K1} + s\,(E_H) \cdot \left[\overline{i_{K2}}\,(E) - \overline{i_{K2}}\,(E_H)\right] \qquad (11b)$$

$$\Delta i_{inst.B} = \Delta i_{K1} + \left[s(E_H) + \Delta s\right] \cdot \left[\overline{i_{K2}}\,(E) - \overline{i_{K2}}\,(E_H)\right] \qquad (11c)$$

$$\Delta i_{inst.B} = \Delta i_{inst.A} + \Delta s \cdot \left[\overline{i_{K2}}\,(E) - \overline{i_{K2}}\,(E_H)\right] \qquad (2o)$$

$$\frac{\Delta i_{inst.B} - \Delta i_{inst.A}}{\Delta s} = \overline{i_{K2}}\,(E) - \overline{i_{K2}}\,(E_H) \qquad (21)$$

Per definitionem ist die "rectifier ratio" am Haltepotential gleich 1 (Noble und Tsien, 1968).
Somit folgt:

$$\frac{\Delta i_{inst.B} - \Delta i_{inst.A}}{\Delta s} = \overline{i_{K2}}\,(E) - 1 \qquad (22)$$

$$\frac{\Delta i_{inst.B} - \Delta i_{inst.A}}{\Delta s} + 1 = \overline{i_{K2}}\,(E) \qquad (22a)$$

Diese Gleichung gibt nun die "rectifier ratio" für jedes Klemmpotential an. Die Gleichung der "rectifier function" oder der vollaktivierten Strom-Spannungs-Beziehung lautet demnach:

$$\overline{i_{K2}} = \frac{\Delta i_{inst.B} - \Delta i_{inst.A}}{\Delta s} \cdot \Delta i_{K2max} \qquad (23)$$

LITERATURVERZEICHNIS

Beumer, H.M. (1969) — Local effects of beta adrenergic blocking drugs in histamin sensitive asthmatics. Pharmacol.Clin. 1, 172-173.

Brown, R.H. and Noble, D. (1972) — Effect of p_H on ionic currents underlying pacemaker activity in cardiac Purkinje fibres. J. Physiol. 224,38 P.

Carmeliet, E.E. (1961) — Chloride ions and the membrane potential of Purkinje fibres. J. Physiol. 156, 375-388.

Cohen, I.; Daut, J. and Noble, D. (1976) — An analysis of the actions of low concentrations of ouabain on membrane currents in Purkinje fibres. J. Physiol. 260, 75-103.

Connor, J.; Barr, L. and Jacobson, E. (1975) — Electrical characteristics of frog atrial trabeculae in the double sucrose gap. Biophys.J. 15, 1047-1067.

Cranefield, P.F.; Hoffman, B.F. and Wit, A.L. (1971) — Block of conduction in partially depolarized cardiac Purkinje fibres induced by an α-adrenergic agent. Nature New Biol. 234, 159-160.

Deck, K.A.; Kern, R. and Trautwein, W. (1964) — Voltage clamp technique in mammalian cardiac fibres. Pflügers Arch.ges.Physiol. 50-62.

Délèze, J. (1970) — The recovery of resting potential and input resistance in sheep heart injured by knife or laser. J.Physiol. 208, 547-562.

Giotti, A.; Ledda, F. and Mannaioni, P.F. (1973) Effects of noradrenaline and isoprenaline, in combination with α - and β-receptor blocking substances, on the action potential of cardiac Purkinje fibres. J.Physiol. 229, 99-113.

Giotti, A.; Ledda, F. and Mannaioni, P.F. (1968) Electrophysiological effects of alpha- and beta-receptor agonists and antagonists on Purkinje fibres of sheep heart. Brit.J. Pharmac. 34, 695 P.

Gill, E.W. and Vaughan-Williams, E.M. (1964) Local anaesthetic activity of the β-receptor antagonist, pronethalol. Nature, 201, 199-200.

Hall, A.E.; Hutter, O.F. and Noble, D. (1963) Current-voltage relations of Purkinje fibres in sodium deficient solutions. J.Physiol. 166, 225-240.

Hashimoto, K.; Hauswirth, O. and Ziskoven, R. (1975) Some aspects of the relation between the current underlying pacemaker activity and beta adrenergic receptors in cardiac Purkinje fibres. Pflügers Arch. ges.Physiol. 359, (suppl.) R 30.

Hashimoto, K.; Hauswirth, O. and Ziskoven, R. (1977) The relation between the current underlying pacemaker activity and beta adrenergic receptors in cardiac Purkinje fibres. Submitted to the Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.

Hauswirth, O.; Noble, D. and Tsien, R.W. (1968) Adrenaline: Mechanism of action on the pacemaker potential in cardiac Purkinje fibres. Science, 162, 916-917.

Hauswirth, O.; Noble, D. and Tsien, R.W. (1972) Separation of the pacemaker and plateau components of delayed rectification in cardiac Purkinje fibres. J. Physiol. 225, 211-235.

Hauswirth, O.; Noble, D. and Tsien, R.W. (1972) The dependence of plateau currentsin cardiac Purkinje Fibres on the interval between action potentials. J. Physiol. 222, 27-49.

Hauswirth, O. and Singh, B.N. (1977) Voltage clamping in cardiac muscle in relation to origin and control of arrhythmias. In preparation, to be submitted to Pharmac. Rev.

Hauswirth, O.; Wehner, H.D. and Ziskoven, R. (1976a) α -adrenergic receptors and pacemaker current in cardiac Purkinje fibres. Nature, 263, 155-156.

Hauswirth, O.; Wehner, H.D. and Ziskoven, R. (1976b) Stereospecificity of beta receptors in cardiac Purkinje fibres. Pflügers Arch.ges.Physiol. 365, (suppl.)R 7.

Hauswirth, O.; Wehner, H.D. and Ziskoven, R. (1977) Stereospecificity of beta adrenergic receptors in relation to the pacemaker current in cardiac Purkinje fibres. Submitted to the Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.

Hodgkin, A.L. and Huxley, A.F. (1952) A quantitative description of membrane current and its apllication to conduction and excitation in nerve. J.Physiol. 117, 500-544.

Hutter, O.F. and Noble, D. (1961) Anion Conductance of cardiac muscle. J.Physiol. 157, 335-350.

Imai, S.; Shigei, T. and Hashimoto, K. (1961) Cardiac actions of methoxamine with special reference to its antagonistic action to epinephrine. Circulation res. 9, 552-560.

Jack, J.J.B.; Noble, D. and Tsien, R.W. (1975) Electric current flow in excitable cells. Clarendon Press, Oxford.

Jacobson, E.; Barr, L. and Connor, J.A. (1975) An equivalent cicuit for small atrial trabeculae of frog. Biophys.J. 15, 1069-1085.

Johnson, E.A. and Lieberman, M. (1971) Heart: Excitation and contraction. A. Rev. Physiol. 33, 479-532.

Kass, R.S. and Tsien, R.W. (1976) Control of action potential duration by calcium ions in cardiac Purkinje fibres. J.gen.Physiol. 67, 599-617.

McAllister, R.E. and Noble, D. (1966) The time and voltage dependence of the slow outward current in cardiac Purkinje fibres. J. Physiol. 186, 632-662.

McAllister, R.E. and Noble, D. (1967) The effect of subthreshold potentials on the membrane current in cardiac Purkinje fibres. J. Physiol. 190, 381-387.

McAllister, R.E.; Noble, D. and Tsien, R.W. (1975) Reconstruction of the electrical activity of cardiac Purkinje fibres. J.Physiol. 251, 1-59.

McGuigan, J.A.S. (1974) Some limitations of the double sucrose gap, and its use in a study of the slow outward current in mammalian ventricular muscle. J. Physiol. 240, 775-806.

Morales-Aguilerá, A. and Vaughan-Williams, E.M. (1965) The effect on cardiac muscle of β-receptor antagonists in relation to their activity as local anaesthetics. Br. J.Pharmac. 24, 332-338.

Mobley, B.A. and Page, E. (1972) The surface area of sheep cardiac Purkinje fibres. J.Physiol. 220, 547-563.

New, W. and Trautwein, W. (1972) Inward membrane currents in mammalian myocardium. Pflügers Archiv ges. Physiol. 334, 1-23.

Noble, D. (1962) A modification of the Hodgkin-Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pacemaker potentials. J. Physiol. 160, 317-352.

Noble, D. (1965) Electrical properties of cardiac muscle attributable to inward going (anomalous) rectification. J.cell.comp.Physiol. (suppl) 66, 127-136.

Noble, D. and Tsien, R.W. (1968) The kinetics and rectifier properties of the slow potassium current in cardiac Purkinje fibres. J. Physiol. 195, 185-214.

Noble, D. and Tsien, R.W. (1969a) Outward membrane currents activated in the plateau range of potentials in cardiac Purkinje fibres. J. Physiol. 200, 205-231.

Noble, D.; Tsien, R.W.(1969b) Reconstruction of the repolization process in cardiac Purkinje Fibres bared on voltage clamp measurements of membrane current. J. Physiol. 200, 233-254.

Papp, J.Gy. and Vaughan-Williams,E.M. (1969)
A comparison of the anti-arrhythmic actions of I.C.I. 50172 and (-)-propranolol and their effects on intracellular cardiac action potentials and other features of cardiac function.
Br.J.Pharmac. 37, 391-399.

Patil, P.N.; LaPidus, J.B. Campbell, D. and Tye, A. (1967)
Steric aspects of adrenergic drugs.II. Effects of DL-isomers and desoxy derivatives on the reserpine-pretreated vas deferens.
J.Pharmac.exp.Ther. 155, 13-23.

Patil, P.N., Miller, D.D. and Trendelenburg, U. (1975)
Molecular geometry and adrenergic drug activity.
Pharmac.Rev. 26, 323-392.

Peper, K. and Trautwein, W. (1969)
A note on the pacemaker current in Purkinje fibres. Pflügers Arch.ges.Physiol. 309. 356-361.

Sommer, J.R. and Johnson, E.A. (1968)
Cardiac Mucsle. A comparative study of Purkinje fibers and ventricular fibers.
J.cell biol. 36, 497-526.

Tsien, R.W. and Noble, D. (1969)
A transition state theory approach to the kinetics of conductance changes in excitable membranes. J.membrane biol. 1, 248-273.

Tsien, R.W.; Giles, W.R. and Greengard, P.(1972)
Cyclic AMP mediates the action of epinephrine on the action potential plateau of cardiac Purkinje fibres.
Nature New Biol. 240, 181-183.

Tsien, R.W. (1973)
Adrenaline like effects of intracellular iontophoresis of cyclic AMP in cardiac Purkinje fibres.
Nature New Biol. 245, 120-122.

Tsien, R.W. (1974a) Effects of epinephrine on the pacemaker potassium current of cardiac Purkinje fibers. J.gen.Physiol. 64, 293-319.

Tsien, R.W. (1974b) Mode of action of chronotropic agents in cardiac Purkinje fibers: Does epinephrine act by directly modifying the external surface charge? J.gen.Physiol. 64, 320-342.

Vasalle, M. (1966) Analysis of cardiac pacemaker potential using a "voltage clamp" technique. Am.J.Physiol. 210, 1335-1341.

Vitek, M. and Trautwein, W. (1971) Slow inward current and action potential in cardiac Purkinje fibres. Pflügers Archiv ges. Physiol. 323, 204-218.

Weidmann, S. (1952) The electrical constants of Purkinje fibres. J.Physiol. 118, 348-360.

Weld, F.M. and Bigger, J.T. (1976) The effect of lidocaine on diastolic transmembrane currents determining pacemaker depolarization in cardiac Purkinje fibers. Circulation res. 38, 203-208.

Zimmer, H.G. (1976) Effects of β-receptor stimulation and ribose supply on myocardial adenine nucleotide metabolism. Pflügers Archiv ges.Physiol. 365, (suppl.) R 3/12.

Zimmer, H.G. and Gerlach, E. (1974) Effect of beta adrenergic stimulation of myocardial adenine nucleotide metabolism. Circulation res. 35, 536-543.

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Otto Hauswirth, meinem hochverehrten Lehrer, meinen besonderen Dank ausdrücken. Er hat mich in die Elektrophysiologie eingeführt, mir den Kontakt zu hervorragenden Vertretern dieser Wissenschaft ermöglicht, meine Arbeit in jeder Weise gefördert und ist mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Dr. Denis Noble, Oxford, und Dr. Richard W. Tsien, Yale, New Haven, möchte ich danken für wertvolle Diskussionen und Hinweise zur vorliegenden Arbeit.

Dr. Keitaro Hashimoto, Dr. Heinz-Dieter Wehner und Dr. Joachim Kaiser danke ich für eine gute Zusammenarbeit.

Den Herren Mondt und Klick, Bonn, verdanke ich die ausgezeichnete technische Ausstattung der Apparatur, die durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft finanziert wurde.

Nicht zuletzt danke ich der Konrad-Adenauer-Stiftung e.V., die mir mit der Gewährung eines Promotionsstipendiums erst die Möglichkeit gab, diese Arbeit fertigzustellen.

Lebenslauf

Am 13. Januar 1951 wurde ich als Sohn des Dipl. Ing. Hans Ziskoven und seiner Frau Gertrud, geb. Hoffmann, in Düsseldorf geboren.
Von 1957 bis 1961 besuchte ich die Volksschule in Düsseldorf - Eller, von 1961 bis 1969 das mathematisch - naturwissenschaftliche Lessing - Gymnasium in Düsseldorf, wo ich auch mein Abitur ablegte. Im Wintersemester 1969 nahm ich an der Universität Bonn das Studium der Chemie auf, ab dem Wintersemester 1972 zusätzlich das Studium der Medizin. Am 23. Februar 1973 legte ich das Vordiplom in Chemie, am 29. März 1973 die naturwissenschaftliche und am 29. März 1974 die ärztliche Vorprüfung der Medizin ab. Am 25. Juli 1977 bestand ich die mündliche Diplomhauptprüfung im Fach Chemie. Am 22. Februar 1978 wurde mir nach Abgabe meiner Diplomarbeit in Physikalischer - Chemie der akademische Grad Diplom Chemiker verliehen. Das Staatsexamen der Medizin beendete ich am 15. Januar 1979 nach der Bestallungsordnung.
Im Sommer 1974 begann ich unter der Leitung meines verehrten Lehrers, Prof. Dr. Otto Hauswirth, die Experimente zu vorliegender Arbeit. Im Verlauf dieser Tätigkeit war es mir möglich, zu Studienaufenthalten in die physiologischen Laboratorien der Universitäten Oxford, Großbritannien, Yale, USA, und Niigata, Japan, zu fahren.
Seit dem 4. Februar 1977 bin ich mit Eva Ziskoven, geb. Deimann, verheiratet.